

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2019

Bc. Barbora Chlopková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OPTIMALIZACE IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA POMOCÍ
MAGNETICKÝCH ČÁSTIC**

OPTIMIZATION OF PLASMID DNA ISOLATION BY MAGNETIC PARTICLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Chlopková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1381/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Barbora Chlopková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Optimalizace izolace plazmidové DNA pomocí magnetických částic

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše, izolace a purifikace plazmidové DNA různými metodami.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Barbora Chlopková
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Teoretická část práce shrnuje poznatky ohledně izolace a přečištění plasmidové DNA a nukleových kyselin jako takových. Plasmidová DNA se používá často v genovém inženýrství jako vektor pro přenos určitého genu do buňky. Její izolace a přečištění v dostatečné kvalitě je klíčovou pro další procesy s tímto spjaté. V experimentální části byla zkoumána izolace a přečištění pDNA pomocí magnetických nosičů v přítomnosti různých koncentrací PEG 8000 v kombinaci s 1M NaCl. Dále byla zkoumána izolace pDNA pomocí komerčních kitů.

ABSTRACT

The theoretical part summarizes information on the isolation and purification of plasmid DNA and nucleic acids as. Plasmid DNA is often used in gene engineering as a vector for the transfer of a particular gene. Its insulation and transportation in sufficient quality is crucial for other processes associated with it. Isolation and survival of pDNA using magnetic carriers of different concentrations of PEG 8000 in combination with 1M NaCl was investigated in experimental parts. Furthermore, the isolation of pDNA using commercial kits was examined.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izolace DNA, izolace plasmidové DNA, magnetické částice, PEG 8 000, 1M NaCl

KEYWORDS

DNA isolation, plasmid DNA isolation, magnetic particle, PEG 8000, 1M NaCl

CHLOPKOVÁ, B. *Optimalizace izolace plasmidové DNA pomocí magnetických částic*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. XY s. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat především vedoucímu diplomové práce doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. a Ing. Otílii Porubiakové za jejich odborné rady, čas a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat starším kolegům v laboratoři. A nesmím opomenout moji rodinu a přátele, kteří mě celou dobu všestranně podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	PLASMIDY	6
2.2	IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN.....	7
2.2.1	Lýze buňky.....	7
2.2.2	Fenol-chloroformová extrakce DNA	7
2.2.3	Srážení a přečištění nukleových kyselin alkoholem	8
2.2.4	Izolace DNA pomocí magnetických nosičů	8
2.2.5	Chromatografické metody	9
2.3	IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA	10
2.3.1	Alkalická lýze buňky.....	10
2.3.2	Dvoufázové vodné systémy	11
2.3.3	Separace pDNA pomocí centrifugace v gradientu CsCl s ethidiumbromidem	11
2.4	MAGNETICKÉ NOSIČE.....	11
2.5	KONDENZACE DNA A VLIV NA ÚČINNOST SEPARACE DNA MAGNETICKÝMI ČÁSTICEMI	13
2.6	TRANSFORMACE pDNA DO BUNĚK.....	14
3	CÍL PRÁCE	15
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
4.1	MATERIÁL	16
4.1.1	Magnetické nosiče.....	16
4.1.2	Bakteriální kultury a plasmidy.....	16
4.1.3	Kity pro izolaci plasmidové DNA.....	17
4.1.4	Chemikálie	17
4.1.5	Přístroje	18
4.1.6	Roztoky.....	19
4.2	METODY	22
4.2.1	Křížové roztěry na LB agarových plotnách s ampicilinem	22
4.2.2	Submerzní kultivace v LB médiu s ampicilinem	22
4.2.3	Příprava kryokonzerv.....	22
4.2.4	Izolace a přečištění plazmidové DNA pomocí kitu	22
4.2.5	Příprava lyzátu z kitu	23
4.2.6	Příprava lyzátu alkalickou lýzí	23
4.2.7	Izolace a přečištění pDNA z lyzátu s pomocí magnetických nosičů	24
4.2.8	Srovnání izolace pDNA kitem a magnetickými nosiči za použití stejného objemu lyzátu.....	25
4.2.9	Přečištění a izolace pDNA z lyzátu pomocí ethanolu	26
4.2.10	UV Spektrofotometrie	26
4.2.11	Agarozová gelová elektroforéza plasmidové DNA	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
5.1.1	Křížové roztěry na LB agarových plotnách s ampicilinem	27

5.1.2	<i>Submerzní kultivace v LB médiu s ampicilinem</i>	27
5.2	SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ KONCENTRACE A ČISTOTY ZJIŠTĚNÝCH POMOCÍ UV SPEKTROFOTOMETRIE	27
5.2.1	<i>Izolace plazmidové DNA pomocí kitu</i>	27
5.2.2	<i>Shrnutí výsledků pokusu A přečištění lyzátů pomocí magnetických nosičů v kombinaci PEG 8000 (8-20%) a 1M NaCl.....</i>	28
5.2.3	<i>Shrnutí výsledků pokusu B přečištění lyzátů pomocí magnetických nosičů v kombinaci 16% PEG 6000 a 2M NaCl</i>	31
5.2.4	<i>Shrnutí výsledků pokusu C přečištění lyzátů pomocí magnetických nosičů v kombinaci s ethanolem</i>	31
5.2.5	<i>Srovnání izolace pDNA kitem a magnetickými nosiči za použití stejného objemu lyzátu.....</i>	32
5.2.6	<i>Shrnutí výsledků přečištění lyzátů pomocí ethanolu</i>	32
5.2.7	<i>Teoretické přepočty a porovnání koncentrace pDNA pomocí kitů a magnetických nosičů</i>	32
5.2.8	<i>Výsledky agarózové gelové elektroforézy plazmidové DNA</i>	35
6	ZÁVĚR	46
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	47
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	50

1 ÚVOD

Plasmidová DNA někdy označovaná také jako pDNA, má využití především v genovém inženýrství jako vektor pro přenos genu. Abychom tyto vektory získali, respektive plasmidovou DNA je potřeba ji izolovat z buňky. Takže prvním krokem je namnožení dostatečné množství kultury obsahující dané plasmidy a pak následuje další krok pro izolaci plasmidové DNA, například pomocí alkalické lyze. Důležité je také oddělení plasmidové DNA od chromozomální. Následně se supernatant obsahující pDNA přečistí, což je možno udělat několika způsoby. V této práci jsem se zaměřila na přečištění pomocí magnetických částic v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG) 8000 a chaotropní soli NaCl. Dále byla tato metoda porovnána s komerčním kitem pro izolaci plasmidové DNA.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Plasmidy

Plasmidy jsou malé kružnicové dsDNA obsažené v bakteriální buňce schopné samostatné replikace [1]. Nejčastěji využívanou hostitelskou bakteriální buňkou pro plasmidy je *Escherichia coli*. [2]. Buňka se bez plasmidů může obejít, ale často nesou zajímavé geny pro buňku jako je resistance k antibiotikům, které, jsou často využívány, jako takzvané selekční markery. Plasmidy se často používají jako klonovací vektory a mají tak hojné využití v genovém inženýrství. Každý plasmid obsahuje jedno nebo více míst *ori* takzvaných počátků replikace, který jim umožňuje se nezávisle replikovat na bakteriálním chromozomu [1,3]. V buňce je možno nalézt plasmidy ve více kopiích na rozdíl od chromozomu, který je přítomen jen jednou. Lokus *Inc* je místo na plasmidu pomocí, kterého se připojuje na membránu buňky. Enzymy, které jsou nezbytné k replikaci plasmidů jsou kódovány buď chromozomovými nebo plasmidovými geny. Jedná se o enzym DNA-polymerázu, která katalyzuje replikaci plasmidové dsDNA a specifickou endonukleázu, jenž štěpí jeden plasmidový polydeoxyribonuleotidový řetězec v místě *ori* [1].

Plasmidy bakterií můžeme rozdělit na konjugativní a nekonjugativní. Plasmidy konjugativní jsou schopny přenosu konjugací pomocí pilusů z donorové buňky do recipientní. Donorová buňka (v tomto případě plasmid) je ta, která poskytuje genom nebo jeho část k přenosu do recipientní buňky. Recipientní buňka tento genom nebo jeho část od donorové tedy přímá. Proces, při kterém se recipientní buňka spojí s donorovou se nazývá konjugace. Konjugativní plasmidy obsahují transférové geny, který podmiňuje konjugaci. Příkladem konjugativního plasmidu je F-plasmid (fertility plasmid), který iniciuje konjugaci u *E.Coli* [1,3]. Dalším příkladem může být R-plasmid, který se vyznačuje rezistencí k antibiotikům [1]. Dále existují Col plasmidy kódující koliciny, což jsou proteiny, které zabíjejí jiné bakterie například plasmid ColE1 v bakterii *E. Coli*. Degradativní plasmidy umožňují hostitelské bakterii metabolizovat zajímavé molekuly jako jsou toluen a kyselinu salicylovou. A virulentní plasmidy propůjčují hostitelské buňce virulenci, kde patří plasmidy Ti bakterie *Afrobacterium tumefaciens*, které způsobují tvorbu nádorů u dvouděložných rostlin [4].

Plasmidy mají různé formy nadšroubovicová (sc), kovalentně uzavřená kružnice (ccc – covalently closed cirkular), otevřená kružnice (oc – open cirkular) a lineární [5].

Pro využití plasmidu jako klonovacího vektoru je ideální použít ccc formu. A to z důvodu, že si tak vybereme ideální místo pro rozštěpení vektoru pomocí vhodné restriční endonukleázy a vložení daného genu do vektoru. Lineární forma pDNA odpovídá skutečné velikosti daného plasmidu a může tak sloužit k identifikaci při agarosové gelové elektroforéze. Tuto formu taktéž můžeme získat při rozštěpení ccc formy pomocí restriktázy. Každá forma plasmidu putuje agarosovým gelem různou rychlostí. Nejrychleji respektive nejdál putuje gelem zpravidla sc forma, pak následuje lineární a nejpomalejší je oc forma plasmidu, v závislosti na podmínkách elektroforézy [6,7].

Plasmidy použité jako klonovací vektory by měly mít následující vlastnosti jako je malá velikost okolo 2-15 kb. Protože malé plasmidy jsou do buňky přenášeny s větší účinností

nežli velké a snadněji se izolují a dosahují v buňkách vysokého počtu kopií. Dále by měly mít schopnost snadného a účinného přenosu do hostitelské buňky, schopnost replikovat se v hostitelské buňce, udržet cizorodou DNA při replikaci a uchovávaní klonů, obsahovat geny podle, kterých jdou selektovat takzvané selekční markery, což mohou být geny, které propůjčují buňkám rezistenci k antibiotikům jako je ampicilin, tetracyklin, chloramfenikol nebo neomycin. Pak musí obsahovat vhodná klonovací místa, kam se začleňuje cizorodá DNA. Do tohoto místa označovaného taky jako restrikční místo se používají příslušné restrikční endonukleázy, což jsou enzymy, které rozštěpí příslušnou oblast vektoru, aby tam následně mohla být umístěna cizorodá DNA. U uměle připravených vektorů bývá většinou seskupeno více restrikčních míst u sebe označované jako mnohočetné klonovací místo neboli polylinker. Je tak možno vybrat si vhodnou restriktazu [2].

2.2 Izolace nukleových kyselin

Izolace DNA je prvním krokem pro mnoho dalších aplikací. Především v oborech molekulární biologie, medicíny, kriminologie, potravinářství, biotechnologie a dalších odvětvích. Je více postupů, jak získat ať už genomovou DNA (chromozomální DNA), plazmidovou DNA označovanou také jako extrachromozomální, popřípadě i RNA [5,8].

2.2.1 Lýze buňky

Prvním krokem pro získání výše zmíněných nukleových kyselin (DNA, RNA a plazmidů) je lyze buňky. Obvykle se pomocí enzymů a detergentů naruší buněčná stěna buňky a její vnitřní obsah včetně DNA se uvolní. K tomu se nejčastěji používá enzym lysozym a z detergentů například SDS (dodecylsulfát sodný). V buňce se dále nacházejí proteiny, různé enzymy, polysacharidy, lipidy, organely a popřípadě další látky. Dále se používá enzym proteináza K, který degraduje přítomné proteiny v buňce, které by se jinak vázaly na DNA a znemožnily, tak její separaci. Součástí lyzačního roztoku je dále chelatační činidlo EDTA, která váže ionty kovů a zabrání aktivitě DNázy, která by vedla k případné degradaci DNA. Z hrubého lyzátu buněk je pak možno izolovat DNA [2,5].

2.2.2 Fenol-chloroformová extrakce DNA

U této metody dochází za použití fenolu, který se přidá k hrubému lyzátu buněk, k rozdělení vzorku na dvě nemísitelné fáze. Dolní organická fáze je fenolová a dostanou se do ní látky, kterých se chceme zbavit a vrchní vrstva je vodná a v ní se nachází naše žádané nukleové kyseliny. Na rozhraní těchto dvou fází je možno spatřit proteinový prstenec. Vodná fáze se tedy opatrně odebere a přečistí pomocí směsi chloroform-isoamylalkoholu (24:1), označované též jako CIZ. CIZ slouží k odstranění fenolu a dalších látek, které by dále vadili například při PCR (polymerázové řetězcové reakci). Po promíchání a centrifugaci se vzorek opět oddělí na dvě fáze, a tak jako předešlém případě se odebere vrchní vodná fáze, která obsahuje nukleové kyseliny, a kterou je dále možno přečistit pomocí srážení ethanolem a octanem sodným. Vysrážená a přečištěná DNA se rozpustí v TE pufru, kde je možno ji i uchovat, popřípadě použít pro další aplikace. Nevýhodou této metody je časová náročnost, a použití toxických látek [2,5].

2.2.3 Srážení a přečištění nukleových kyselin alkoholem

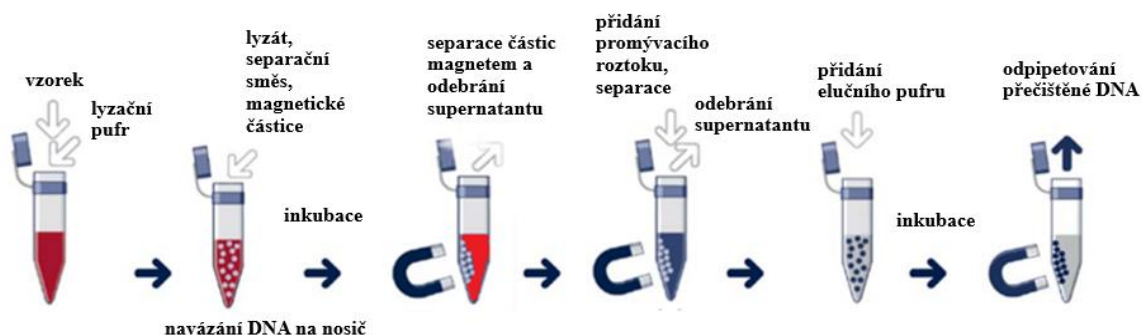
Tato metoda je vhodná pro přečištění vzorků jak po fenol-chloroformové extrakci, tak pro přečištění plasmidové DNA získané pomocí alkalické lýze. V prvním případě se zbavíme především stop fenolu a chloroformu. Především fenol by mohl způsobit nežádoucí denaturaci enzymů či jinak narušit další kroky pro použití nukleové kyseliny. Například by mohl vadit při polymerázové řetězové reakci (PCR), kde působí jako inhibitor. Na přečištění pDNA je pak vhodná kombinace octanu amonného s izopropanolem [2].

K srážení neboli precipitaci alkoholem se nejčastěji používá ethanol nebo isopropanol. Srážení nukleových kyselin do podoby agregátu, který pomocí centrifugace sedimentuje na dno zkumavky je možné získat použitím kombinace alkoholu a jednomocných iontů jako jsou Na^+ , K^+ nebo NH_4^+ . V takovém případě pak jednoduše slijeme supernatant, necháme odpařit zbytky alkoholu a vzniklý agregát nukleové kyseliny můžeme rozpustit v TE pufru. Snížením teploty až na $-70\text{ }^\circ\text{C}$ v kombinaci solí jako je 2M NaCl, 2M LiCl, 3M octanu sodného nebo 10M octanu amonného je možno účinně vysrážet i nukleové kyseliny v nízkých koncentracích. Nevýhodou je však značná neselektivita, takže pokud chceme především DNA s minimální přítomností RNA, tak srážení provádíme za laboratorní teploty. Případné zbytky solí, které se také mohou srážet spolu s nukleovou kyselinou je možno odstranit promytím 70% ethanolem [2].

Dalšími možnostmi pro precipitaci plasmidové DNA ve velkovýrobě kromě zmiňovaného ethanolu a izopropanolu jsou polyethylenglykol, kationtové detergenty, například cetyltrimethylamoniumbromide (CTAB), určité soli, jako je například LiCl a CaCl_2 , polyaminy jako spermidin a polyethylenimin. Slouží k odstranění většiny kontaminantů ve velkoobjemové přípravě bez použití drahých chromatografických separací. [21,22]

2.2.4 Izolace DNA pomocí magnetických nosičů

DNA lze ze vzorku izolovat pomocí magnetických nosičů s vhodnými funkčními skupinami. Jedná se o reverzibilní adsorpci nukleové kyseliny na nosič. Vzorek, respektive lyzát obsahující nukleové kyseliny se smíchá s magnetickými částicemi. Po době potřebné na navázání DNA na nosiče se vzorek umístí do magnetického separátoru, kde magnet drží částice s navázanými nukleovými kyselinami na místě a supernatant obsahující nečistoty se odebere. Potom se přidá promývací roztok, nejčastěji jde o roztok ethanolu a po důkladném promytí a zbavení všech nečistot se následně zas opatrně odebere supernatant s nečistotami. Nakonec se přidá eluční pufr, který uvolní nukleové kyseliny z nosiče do tohoto pufru. Takže nukleová kyselina již obsažená v tomto pufru se opatrně odebere, zatímco částice drží magnet. Takto získaná DNA se následně může použít pro různé aplikace. Na Obrázku 1 je znázorněn tento proces separace [8,9,10].



Obrázek 1: Schéma izolace a přečištění DNA pomocí magnetického nosiče.

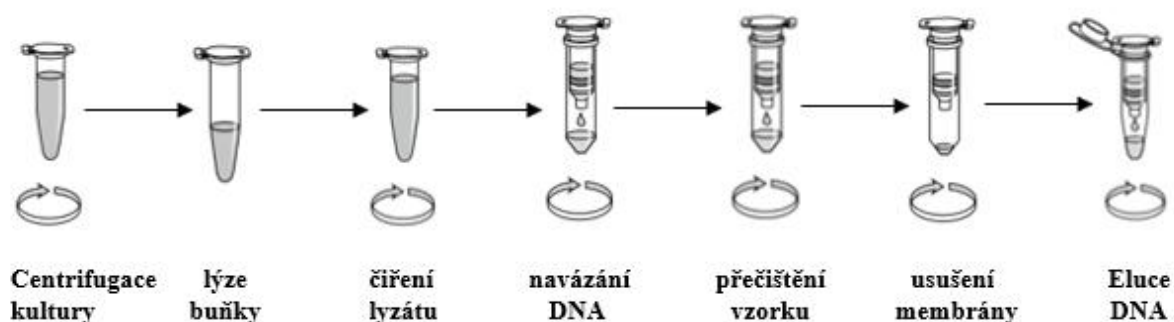
Převzato a upraveno podle [10]

2.2.5 Chromatografické metody

Chromatografické metody umožňují získat vzorky nukleových kyselin vysoké čistoty. Podle interakce vzorku s nosičem se dělí do několika skupin [2].

2.2.5.1 Spin columns

Jde o metodu kombinující chromatografii s centrifugací. S touto metodou se setkáme u komerčních izolačních kitů. Chromatografické kolonky obsahují nejčastěji silica membránu (silikagel), na kterou se naváže za vhodných podmínek pomocí daných roztoků DNA a po přečištění a zvolených dalších vhodných roztoků se navázané DNA zase uvolní. Zda-li se DNA naváže nebo uvolní je dáno především pH a iontovou silou roztoku. Kolonky jsou vkládány do centrifugačních zkumavek a následně do centrifugy a využívá se tu tedy kombinace principu adsorpce/desorpce na pevném nosiči a zároveň působení odstředivé síly. Pomocí této kombinace je izolace pomocí kitů rychlá a snadná [2]. Na Obrázku 2 je znázorněno schéma izolace pDNA pomocí kitu. Kdy se nejprve zcentrifuguje přes noc narostlá bakteriální kultura obsahující pDNA. Supernatant se slije a k peletě buněk se postupně přidávají roztoky pro alkalickou lzy s RNázou: V tomto kroku dochází k vysrážení genomové DNA, která se oddělí následnou centrifugací, tzv. čiření lyzátu. Supernatant obsahující pDNA je odpipetován na kolonku se silikátovou membránou, opět se centrifuguje a při tom se naváže pDNA na membránu. Potom se přidají promývací roztoky, většinou obsahující ethanol, které zbaví vzorek nečistot. Následně se nechá kolonka další centrifugací vysušit, abychom se zbavili zbytků ethanolu. A v posledním kroku se napipetuje na membránu eluční pufr, nechá se krátce inkubovat a při centrifugaci se pDNA původně navázaná na membránu uvolní a ve zkumavce máme požadovaný vzorek pDNA [11].



Obrázek 2: Schéma izolace pDNA pomocí kitu. Převzato a upraveno podle [11]

2.2.5.2 Gelová chromatografie

Kolona je naplněna malými porézními zrnky nosiče, na níž se nanáší vzorky. Velké molekuly jako nukleové kyseliny procházejí kolonou rychleji, zatímco malé molekuly jako jsou ionty a volné nukleotidy prostupují do porézní matrice, kde jsou zadržovány a prostupují, tak kolonou pomaleji. Jde o účinnou alternativu purifikace k purifikaci DNA srážením alkoholem [2].

2.2.5.3 Iontoměničová chromatografie

Při této metodě dochází k interakci mezi náplní kolony a makromolekulami vzorku. U vzorků nukleových kyselin se využívá interakce záporně nabitě fosfátové kostry s kladně nabitými chemickými skupinami nosiče [2,23]. Iontoměničová chromatografie je vhodná pro oddělení sc pDNA od oc pDNA v gradientu soli. Je možno dosáhnout až 95% čistoty bez téměř nedetekovatelné hladiny endotoxinů, genomové DNA, RNA a proteinu [20].

2.3 Izolace plasmidové DNA

Základním krokem pro izolaci plasmidové DNA je mít na kultivované bakteriální kulturu obsahující plasmidy. Kultivace probíhá za selekčního tlaku, kdy se většinou využívá přítomnosti genu v plasmidu, který je resistentní k antibiotikům. Takže přidáme-li do média dané antibiotikum vyrostou jen bakterie obsahující plasmidy s tímto genem. Dalším krokem je alkalická lýze buňky [1,2,5].

2.3.1 Alkalická lýze buňky

Plasmidovou DNA je možno získat pomocí alkalické lýze. Zvýšení pH na 12 nejčastěji pomocí NaOH vede k přerušení vodíkových vazeb mezi nukleotidy a oddělení lineárních řetězců, což vede k denaturaci DNA. Zatímco chromozonová DNA se v přítomnosti SDS a neutralizačního roztoku obsahujícího octan draselný nestihne renaturovat a agreguje, plasmidová DNA, která je v nadšroubovicovém stavu a její řetězce se nemohou oddělit se po neutralizaci vrátí do původní podoby. Následně se centrifugací oddělí chromozonová DNA ve formě sraženiny od plasmidové, která zůstane v supernatantu. Supernatant obsahující pDNA je pak možno opatrně odpipetovat a následně přečistit různými látkami a způsoby: Například RNA se lze zbavit pomocí přídatku RNázy nebo LiCl. Přečistiti lze ethanolem, octanem amonným a izopropanolem, afinitní chromatografií, centrifugací v gradientu CsCl s ethidiumbromidem, magnetickými nosiči atd [2,5].

2.3.2 Dvoufázové vodné systémy

Pro extrakci biomolekul jsou vhodné dvoufázové vodné systémy. Ty je možno připravit přidavkem dvou hydrofilních polymerů do vodného roztoku, kde je nejčastěji využíván polyethylenglykol o molekulové hmotnosti (1400 až 6000) a dextran. Popřípadě druhou možnou variantou je smíchání jednoho hydrofilního polymeru do roztoku vhodné soli. Jde například o sodné a draselné soli fosforečnanu, dihydrofosforečnanu a hydrogenfosforečnanu. Vhodně zvolenou koncentrací složek se vytvoří dvě nemísitelné fáze. Záleží na typu použitého polymeru a jeho molekulové hmotnosti, typu soli, pH a teplotě. Hydrofilní sloučeniny jako jsou nukleové kyseliny přecházejí častěji do dolní vodné fáze, zatímco látky obsahující jak polární, tak nepolární skupiny jako jsou například proteiny se mohou extrahovat jak do horní PEG fáze, tak spodní hydrofilní fáze [12].

Pro izolaci pDNA v maximálním výtěžku bez RNA a s nepatrným množstvím kontaminujících proteinů je možno použít dvojí extrakci. A to nejprve v systému PEG 600 a síranu amonného, kdy se odstraní většina nečistot do horní fáze. Dolní fáze obsahující pDNA se potom odebere a přečistí v druhém systému tvořeného PEG 3350 a dextranu 110 doplněným malým množstvím pegylovaného polyethyleiminu (pPEI) (0,2%) [13].

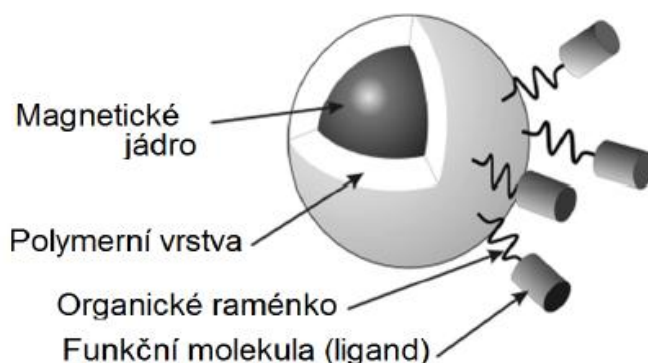
2.3.3 Separace pDNA pomocí centrifugace v gradientu CsCl s ethidiumbromidem

Tato metoda slouží k separaci různých forem DNA jako je kovalentně uzavřená kružnice pDNA od otevřených, lineárních a multimerních molekul pDNA a chromozomové DNA [2,21]. Jde o speciální případ izopyktní centrifugace v gradientech CsCl za přítomnosti ethidiumbromidu. Ethidiumbromid se naváže na DNA, čímž se její vznášivá hustota významně snižuje, přičemž množství navázaného ethidiumbromidu a tím i pokles hustoty DNA závisí na jejím strukturním typu [2]. Touto metodou lze získat pDNA velmi vysoké čistoty, avšak je časově náročná a nákladná. Je nutno použít ultracentrifugu cca při 450 000 x g po dobu 4 hodin i více. Další nevýhodou je použití ethidiumbromidu, který je silným mutagenem. Po proběhlé centrifugaci se kyveta opatrně vyjme a v UV světle je pak možno pozorovat rozdělení na jednotlivé pruhy. Spodní pruh odpovídá nadšroubovicové cirkulární formě pDNA a v horním jsou relaxované formy chromosomální a plasmidové DNA. RNA bývá obvykle přichycena dole na stěně kyvety. Požadovanou cirkulární formu pDNA je možno odebrat propíchnutím kyvety pomocí injekční stříkačky v dané oblasti a opatrným nasátím. Takto odebraná pDNA se následně zbaví ethidium bromidu pomocí přidavku roztoku butanolu s vodou. Po protřepání vzorku se pak odebere horní butanolová fáze, do které přejde ethidium bromid. To se provádí do odbarvení spodní vodné fáze obsahující pDNA. Následně se pDNA precipituje pomocí isopropanolu při -20 °C. Potom se vzorek zcentrifuguje a k vysušená peleta se rozpustí v TE pufru [6,21].

2.4 Magnetické nosiče

Magnetické nosiče se obvykle skládají ze tří hlavních částí. Z jádra, které je tvořeno magnetickým materiálem, povrchovým materiálem, kterým je jádro pokryto a brání případným nežádoucím interakcím a funkčními skupinami, které zajišťují požadovanou reaktivitu s analytem. Jádro nemusí být nutně pokryto polymerní vrstvou, záleží vždy, pro

jakou aplikaci bude použito. Základní schematický popis magnetického nosiče je možno znázornit tímto obrázkem (Obrázek 3) [8,9].



Obrázek 3: Obecné schéma magnetického nosiče. Převzato a upraveno z [14].

Magnetické jádro je tvořeno materiálem vykazujícím paramagnetické, popřípadě superparamagnetické vlastnosti. Paramagnetické látky vykazují magnetické vlastnosti jen v přítomnosti magnetického pole a po odstranění vnějšího magnetického pole nevykazují žádný zbytkový magnetismus. Supermagnetické látky vykazují kombinaci paramagnetických a feromagnetických vlastností a po odstranění vnějšího magnetického pole nevykazují téměř žádný zbytkový magnetismus. Této vlastnosti lze využít a magnetické nosiče dle potřeby separovat ze vzorku pomocí magnetického separátoru. Zato v nepřítomnosti magnetického zdroje nosiče nevykazují zbytkový magnetismus a nedochází k jejich nechtěné agregaci. Částice mají mikro až nanorozměry a jsou anorganické povahy. Superparamagnetické materiály jsou nejčastěji založeny na oxidech železa, jako je například magnetit Fe_3O_4 , maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferity – $\text{MO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}$ (M: Co, Cu, Mn, atd.) připraveny spolu srážením M^{2+} a M^{3+} solí a $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$ manganátého peroskvitu. Materiály založené na oxidech železa jsou relativně bezpečné, netoxické a obvykle dobře tolerovány *in vivo*. Na druhou stranu některé druhy nanočástic mohou poškodit DNA. Jsou známy případy, kdy oxid titaničitý rozbil dvou-šroubovici DNA, a u kobaltu železitého se ukázalo, že vykazuje genotoxické působení na jaterní tkáň [8,9].

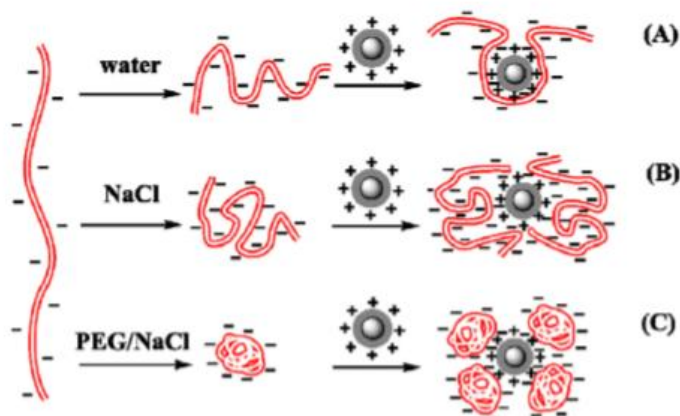
Magnetické jádro je vhodné pokrýt biokompatibilními polymery, které brání nežádoucím reakcím s analytem, živým systémem, popřípadě zabrání případné inhibici při polymerové řetězcové reakci (PCR). Jako příklad můžeme uvést kyselinu alginovou, poly(vinylalkohol), dextran a další nízko či vysoko molekulární sloučeniny. Povrchové materiály dále zlepšují koloidní stabilitu ve fyziologických médiích, zabráňují případné toxicitě a minimalizují absorpci proteinu na povrch nanočástic. Zvláště polyethylenglykoly (PEGs) s dlouhými polymerními řetězci které jsou vysoce rozpustné ve vodě a netoxické, nachází význam aplikací stabilizující systém a roznos léčiv biologickými molekulami. Krycí vrstva může být dále připravena z inertních materiálů, jako je fosforečnan vápenatý nebo apatit. Vzácně se můžeme setkat s nanočásticemi pokrytými zlatem, které jsou obvykle funkcionalizovány oligonukleotidy s thiolovou skupinou na jednom konci a jedno-řetězcovým nukleotidem.

Nanočástice oxidu železitého pokrytého zlatem s imobilizovanou DNA sondou byly použity jako součást elektrochemického DNA biosenzoru [8,9].

Funkční skupiny zajišťují reaktivitu s požadovaným analytem a jsou ukotveny na povrchovém krytu magnetických částic. Povrch může být funkcionalizován pozitivně nabitými molekulami jako jsou například amino skupiny ($-\text{NH}_2$), které zvyšují elektrostatickou afinitu k fosfátové páteři DNA případně RNA (je negativně nabitá) a umožňují tak separaci a purifikaci DNA/RNA ze vzorku. I záporně nabitá funkční skupina jako je například skupina karboxylová ($-\text{COOH}$) může být překvapivě použita pro izolaci nukleových kyselin, plasmidové DNA a bakteriální DNA z různých komplexních vzorků. Je však nezbytné dodržet podmínky kondenzace DNA, kdy je nutná přítomnost PEG 6000 (nebo PEG 8000) a NaCl [8,9].

2.5 Kondenzace DNA a vliv na účinnost separace DNA magnetickými částicemi

Pro účinné navázání nukleových kyselin na magnetický nosič s karboxylovými funkčními skupinami, které jsou záporně nabité, je potřeba, aby byla DNA v tzv. kondenzovaném stavu, čehož docílíme správnou koncentrací chaotropní soli a polyethylenu (PEG) [8,9]. PEG a NaCl jsou pro tento účel často využívanými kondenzačními činidly. Polyethylenglykol slouží ke zvýšení osmotického tlaku a sůl ke kompenzaci nábojů v molekule DNA [15]. Další použitelné chaotropní soli jsou například jodid sodný, guanidin hydrochlorid, guanidin isothiokyanát, chloristan sodný a trichloracetát sodný [16]. Tato kondenzační strategie je možná použít i pro magnetické částice s kladnými funkčními skupinami jako jsou aminoskupiny. I v tomto případě dochází ke zvýšení účinnosti separace nukleových kyselin pomocí magnetických nosičů. Obrázek 4 znázorňuje tento jev, kde červeně je znázorněna dvouvláknová DNA a šedě magnetické nosiče. Konformace, v které se DNA nachází má vliv na účinnost adsorpce DNA na magnetický nosič. V případě C je DNA vlivem kondenzačních činidel PEG a NaCl v kondenzovaném stavu a zaujímá daleko menší prostor, a tak se na magnetický nosič může navázat více molekul DNA. Pokud je DNA v rozbaleném stavu, vlákna dvoušroubovice zaujímají větší prostor, nežli samotné magnetické částice, což je možno vidět na případě A a B v Obrázku 4. Vlákna DNA jsou tak schopna navázat se na více funkčních skupin na jednotlivém nosiči, popřípadě reagovat s několika nosiči na jednou a znemožnit tak navázání dalších molekul DNA na nosič [17].



Obrázek 4: Znázornění navázání DNA na magnetické částice za různých podmínek.

Převzato z [17]

2.6 Transformace pDNA do buněk

Transformací se označuje vnesení izolované molekuly DNA do bakteriální buňky. K transformaci může docházet spontánně u recipientních buněk ve stavu kompetence, což je schopnost transformovat DNA z média do buňky. Vnesení DNA do buněk je možno provést metodou elektroporace a metodou s CaCl_2 . Metoda elektroporace je nejúčinnější a velmi rychlá, ale vyžaduje speciální a nákladné zařízení, zato umožňuje i přenos velkých plasmidů. Buňky jsou vystaveny silnému elektrickému šoku při, kterém se otevřou póry buňky a umožní tak proniknutí DNA do buněk. Tou to metodou lze dosáhnout až 10^9 - 10^{10} transformantů na $1 \mu\text{g}$ plasmidové DNA. Při další metodě je používán CaCl_2 pro přípravu buněk schopných přijmout plasmidovou DNA, tzv. kompetentních buněk. Tato metoda není sice tak účinná jako předchozí, ale jednoduchá a umožňuje získané kompetentní buňky skladovat až několik měsíců při -70°C . Důležité je, aby byly buňky v optimálním fyziologickém stavu. To znamená získat buňky v počátku logaritmické fáze, následující kroky provádět při 4°C a centrifugovat maximálně do $1600 \times g$. Tato metoda je i modifikována například použitím Rb^+ , Mn^{++} nebo K^+ iontů namísto Ca^{++} případně přidavky různých činidel jako je dithiothreitol nebo dimethylsulfoxid [6].

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo shrnout poznatky ohledně izolace a purifikace plasmidové DNA. Cílem praktické části bylo izolovat plasmidovou DNA pomocí magnetických nosičů a pomocí komerčního kitu a porovnat výsledky jednotlivých metod.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Magnetické nosiče

Pro přečištění a izolaci pDNA byly použity magnetické nosiče Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™, s karboxylovými funkčními skupinami, s velikostí 1 µm, 3 EDAC/PA5. Na Obrázku 5 je možno vidět schématické znázornění nosiče, kde jsou vidět dvě vrstvy magnetitu, které by měly dvakrát zrychlit odezvu na magnetické pole, než je tomu u podobných částic téže firmy s jednou vrstvou magnetitu označované jako Sera-Mag™ Magnetic Beads™ [18].

Sera-Mag Magnetic SpeedBeads



Obrázek 5: Průřez magnetickým nosičem Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ a popis jednotlivých vrstev. Převzato a upraveno z [18]



Obrázek 6: Schématické znázornění magnetického nosiče Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ a popis jednotlivých vrstev. Převzato a upraveno z [18]

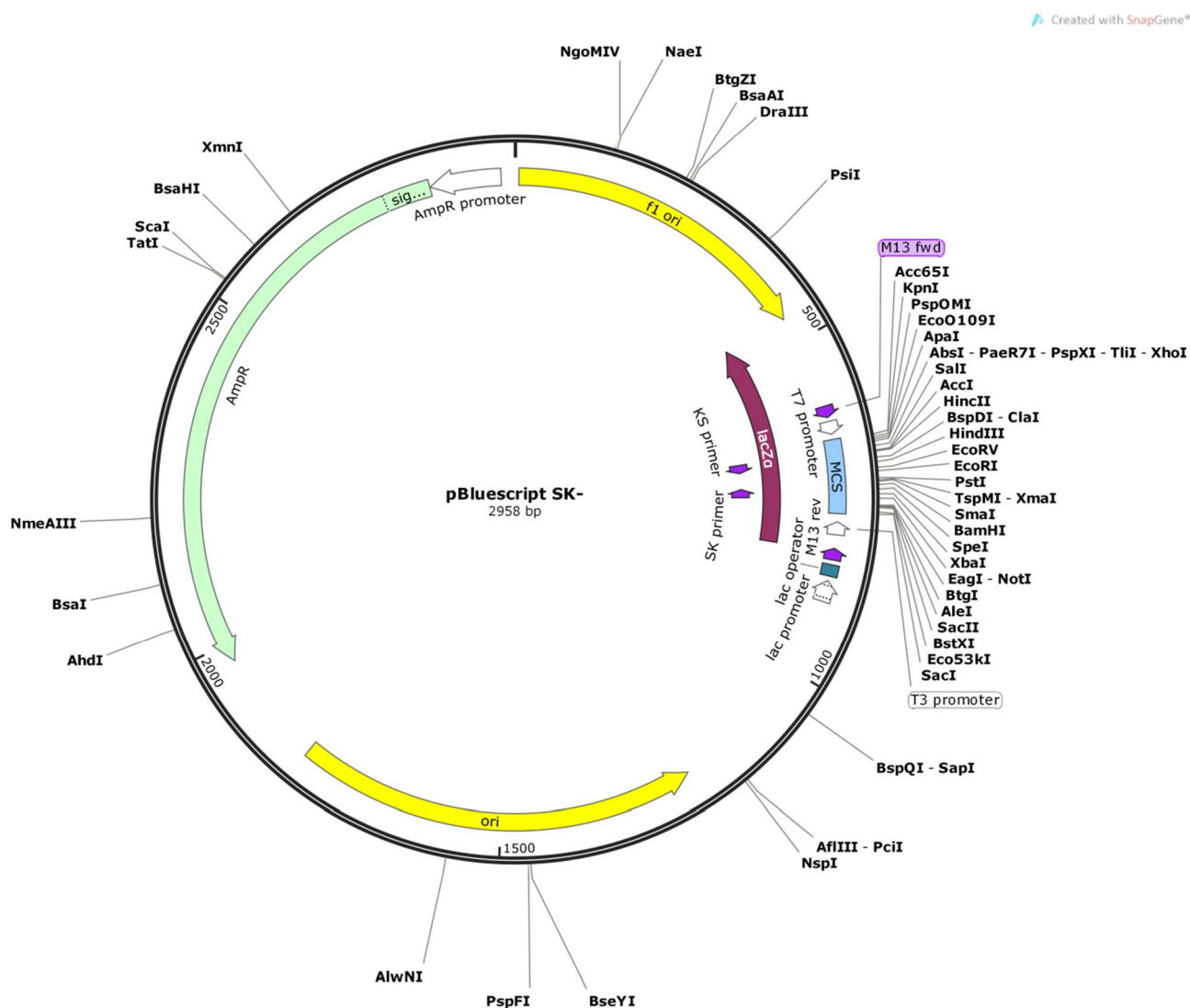
Jak je vidno na Obrázku 6, tak tento magnetický nosič je tvořen polystyrénovým jádrem, na kterém je 1. vrstva magnetitu, ten je zapouzdřen další vrstvou, kterou tvoří polymer, následuje 2. vrstva magnetitu a poslední finální vrstva je vrstva polymeru s karboxylovými funkčními skupinami zajišťující interakci s nukleovými kyselinami.

Jako druhý nosič byl použit MQ Binding Beads (EPIGENTEK).

4.1.2 Bakteriální kultury a plasmidy

Bakteriální kultury s již transformovanými plasmidy byly poskytnuty doc. Mgr. Václavem Brázdou, Ph.D. z Biofyzikálního ústavu, Akademie věd ČR. Šlo o *Escherichia Coli* STBL4

(pBluescript SK-) a *Escherichia Coli* STBL4 (pB-3MYC). Na Obrázku 7 je znázorněna mapa vektoru pBluescript SK-. Velikost plasmidu pBluescript SK- je 2 958 pb., jde o high copy plasmid, tedy že jeho počty kopií na buňku jsou poměrně vysoké. Obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu, který je na obrázku mapy vektoru znázorněno jako *AmpR*. Dále obsahuje *lacZ* operon, umístěný v polylinkeru, který se dá využít při modro-bílé selekci [19].



Obrázek 7: Mapa vektoru pBluescript SK- Převzato z [19]

4.1.3 Kity pro izolaci plasmidové DNA

kit NucleoSpin® Plasmid 1-ZK-06-2681

Kit ISOLATE II Plasmid Mini Kit, Bioline

4.1.4 Chemikálie

Yeast Extract Powder (HIMEDIA)

Agar powder, Bacteriological (HIMEDIA)

Tryptone from casein pancreatic (SERVA)

Ampicilin 0,5 Biotika inj.

PEG 8000 (Sigma-Aldrich)

PEG 6000 (SERVA)

SDS (Biotechnology)

hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)

chlorid sodný (Lach:ner, ČR)

kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)

ethanol (Penta, Chrudim, ČR)

kyselina ethylendiamintetraoctová (Penta, Chrudim ČR)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Penta, Chrudim ČR)

octan draselný (Lachema, Brno, ČR)

lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)

kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)

agaróza na elektroforézu DNA (SERVA, ČR)

žebříček 1Kb DNA Ladder RTU, NIPPON Genetitics EUROPE GmbH o velikostech 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000 a 10 000 bp.

GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water (Biotium)

4.1.5 Přístroje

Elektroforetická vana model Owl D2 Wide Gel System s elektrickým zdrojem

centrifuga MINI spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Německo)

centrifuga 5430 R (Eppendorf, Německo)

Analytické váhy Kern ew (Novot', SK)

Laboratorní váhy B0430 (Ohaus, USA)

Magnetický separátor chemagic™ Magnetic Stand 2x12 (PerkinElmer chemagen Technologie GmbH, Německo)

mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)

dokumentační systém c200 Azure Biosystems (iBioTech, ČR)

UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramount, USA)

Třepačka Heidolph TITRAMAX 1000 s inkubátorem s krytem

Sterilní box BioAir instruments aura mini s UV lampou

Vortex – Geniez MO Bio Laboratories, Inc.

Nanodrop ND-2000/2000c (Thermo Scientific, USA)

a další běžné laboratorní pomůcky

4.1.6 Roztoky

Návody na přípravu roztoků jsou většinou převzaty s menšími úpravami ze skript doc. Španové a doc. Ritticha [5] popřípadě z Genové inženýrství od prof. Rumla [6]. Všechny roztoky byly sterilizovány nebo umíchány ze sterilních roztoků.

4.1.6.1 Roztoky pro kultivaci

LB (Luria-Bertani) médium a LB agar

látky	Požadovaná koncentrace v g/l
tryptone	10
kvasniční extrakt	5
NaCl	5
agar	15

Například pro přípravu 200 ml LB média, bylo naváženo 2 g tryptonu, 1 g kvasničního extraktu, 1 g NaCl a přidáno 200 ml destilované vody. Stejným postupem bylo připraveno LB médium s přídavkem 3 g agaru pro výrobu agarových ploten. Oba roztoky byly následně sterilizovány.

Zásobní roztok ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml, byl přidáván do LB média, tak aby byla jeho výsledná koncentrace 100 µg/ml. Například 200 µl ampicilinu na 200 ml LB média.

4.1.6.2 Roztoky pro alkalickou lýzy

GLC s lysozymem

Bylo smícháno 25 µl 50 mM glukózy, 10 µl 10 mM EDTA (pH 8,0), 12,5 µl 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) a 425,5 µl destilované vody. Lysozym byl přidán těsně před použitím, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 0,2 mg/ml.

Roztok lysozymu

Bylo naváženo 20 mg lysozymu a rozpuštěno v 1 ml sterilní destilované vodě. Uchováváno při -20°C

LYZ

Bylo smícháno 100 µl 2 M NaOH, 25 µl 1 % SDS a 375 µl destilované vody.

SDS (20 %)

20 g dodecyl sulfátu sodného (SDS) bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody při zahřívání na teplotu 68 °C, koncentrovanou HCl bylo upraveno pH na 7,0 a roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml

HS

Bylo smícháno 60 ml 5 M octanu draselného a 40 ml kyseliny octové (p.a.), výsledné pH odpovídalo 4,8

TE pufr

Byl smíchán 1 ml (pH 8,0) 1 M Tris-HCl, 0,2 ml (pH 8,0) 0,5 M EDTA a roztok byl doplněn na objem 100 ml destilovanou vodou

1 M Tris-HCl

12,1 g Tris-HCl bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody a pomocí koncentrované HCl bylo pH upraveno na 8,0 a doplněno na 100 ml.

0,5 M EDTA

18,6 g EDTA bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody a pH bylo upraveno přidáním 2 g hydroxidu sodného a doplněno na 100 ml.

4.1.6.3 Rostoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

Pro detekci pDNA se používá 1 % agarózový gel, ten byl připraven smícháním například 1,5 g agarózy se 150 ml 1x koncentrovaného TAE pufru

TBE pufr (5x koncentrovaný)

Byl připraven z 54 g Tris-báze, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5 M EDTA; navážka byla rozpustěna v 600 ml destilované vody, roztok byl následně doplněn destilovanou vodou na objem menší než 1 l, pH bylo upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu 8,0 a konečný objem byl doplněn na 1 l destilovanou vodou, před použitím byl roztok zředěn 10x destilovanou vodou na koncentraci 0,5x TBE.

TAE pufr (50x koncentrovaný)

2M Tris base, 1M kyselina octová, 50 mM EDTA

Navážka 242 g Tris báze byla rozpustěna v 800 ml za stálého míchání, bylo přidáno 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5M EDTA (pH 8) a doplněno do 1 litru.

nanášecí pufr (6x koncentrovaný)

Byl připraven navážkou 4mg bromfenolové modři a 250 mg Ficcol 400 a rozpuštěn v 10 ml sterilní destilované vody. Následně uchován ve 4°C.

DNA standart (žebříček DNA) 1Kb o velikostech 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000 a 10 000 bp

Barvivo GelRed

4.1.6.4 Roztoky pro izolaci pDNA pomocí magnetických nosičů

5 M NaCl

58,4 g NaCl bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 200 ml a následně sterilizován v autoklávu (121 °C/15 minut).

40 % PEG 6000

Do sterilního odměrného válce o objemu 25 ml bylo naváženo 10 g PEG, pak bylo pomocí sérologické pipety přidáno ne víc jak 14 ml sterilní destilované vody. Válec byl uzavřen parafilmem a obsah byl důkladně promíchán, dokud se nerozpustily veškeré bílé šupinky PEG. Roztok se stal velmi viskózním. Roztok se nechal chvíli ustát, dokud všechn nestekl ze stěn válce, pak byl objem doplněn sterilní destilovanou vodou na 25 ml, opět uzavřen parafilmem a důkladně promíchán. Následně byl roztok přelit do kónické zkumavky a uskladněn v lednici.

50 % PEG 8000

Do sterilního odměrného válce o objemu 25 ml bylo naváženo 12,5 g PEG, pak bylo pomocí sérologické pipety přidáno ne víc jak 14 ml sterilní destilované vody. Válec byl uzavřen parafilmem a obsah byl důkladně promíchán, dokud se nerozpustily veškeré bílé šupinky PEG. Roztok se stal velmi viskózním. Roztok se nechal chvíli ustát, dokud všechn nestekl ze stěn válce, pak byl objem doplněn sterilní destilovanou vodou na 25 ml, opět uzavřen parafilmem a důkladně promíchán. Následně byl roztok přelit do kónické zkumavky a uskladněn v lednici.

80 % ethanol

Byl připraven smícháním 96 % ethanolu s destilovanou vodou.

TE pufr

Roztok byl připraven smícháním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněn sterilní destilovanou vodou do 100 ml.

4.2 Metody

4.2.1 Křížové roztěry na LB agarových plotnách s ampicilinem

Byly připraveny 2 Petriho misky s LB agarem s přidavkem ampicilinu, na kterých byly provedeny křížové roztěry. Jedna byla pro pBluescript a jedna pro pB-3MYC. Pro křížový roztěr byly použity sterilní kličky. Připravené vzorky putovaly do termostatu na 24 h při teplotě 37°C.

4.2.2 Submerzní kultivace v LB médiu s ampicilinem

Byly připraveny dva vzorky jeden pro pB-3MYC a jeden pro pBluescript. Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 35 ml LB média, do kterého bylo přidáno 35 µl ampicilinu. Následně byla sterilní kličkou odebrána 1 narostlá kolonie z křížového roztěru z předešlého dne. Klička s kolonií byla rozsuspendována do média. Takto připravené vzorky byly přemístěny na třepačku, kde probíhala submerzní kultivace přes noc po dobu cca 16 hodin při 37°C.

4.2.3 Příprava kryokonzerv

V obou Erlenmayerovy baňkách, kde proběhla submerzní kultivace byl vidět zákal značící nárůst buněk. Byly připraveny 4 kryokonzervy 2 pro pB-3MYC a dvě pro pBluescript. Do Ependorfových zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml tekuté kultury a 0,5 ml 80% glycerolu. Vzorky byly umístěny do mrazničky na -80°C. Takto připravené kultury byly dále používány pro submerzní kultivaci, kdy bylo možno ihned nabrat kulturu pomocí sterilní kličky a rozsuspendovat v LB médiu s ampicilinem.

4.2.4 Izolace a přečištění plazmidové DNA pomocí kitu

- Centrifugace kultury
 - Vzorky kultur po submerzní kultivaci byly přelity do centrifugačních zkumavek a centrifugovány při 6000 rpm, při 37 °C po dobu 3 min. Supernatant byl slit a shluk buněk byl zvortexován a následně změřen jejich objem pomocí pipety, objem buněk odpovídající 1,5 ml byl odpipetován do 1,5 ml Ependorfovy zkumavky. Případně bylo přímo odpipetováno 1,5 ml kultury do 1,5 ml Ependorfovy zkumavky a centrifugováno podle návodu v kitu na 11 000 g po dobu 30 s a poté byl slit supernatant.
- Lýze buňky
 - K připravené peletě v předešlém kroku bylo postupně přidáno
 - 250 µl roztoku A1 a vzorek byl zvortexován.
 - Dále bylo přidáno 250 µl roztoku A2 a vzorek byl jemně promíchán převrácením zkumavek 6 - 8krát a inkubován za laboratorní teploty, maximálně 5 minut.
 - Nakonec bylo přidáno 300 µl roztoku A3 a opět jemně promícháno převrácením (6 - 8krát
- Čiření lyzátu
 - Vzorky byly centrifugovány 10 minut při 11 000 g za laboratorní teploty. V tomto kroku došlo k oddělení genomové DNA od plazmidové. (Pro jednu část pokusu bylo pokračováno až do konce tohoto postupu, pro druhou část byl použit supernatant (lyzát z kitu) pro přečištění magnetickými nosiči.)
- Navázání DNA

- Kolonky byly vloženy do 2 ml sběrných zkumavek, supernatant z 3. kroku byl přelit, popřípadě odpipetován na kolonku. Dále proběhla centrifugace po dobu 1 min. při 11 000 g.
- Promytí/přečištění vzorku
 - Bylo přidáno 500 µl roztoku AW ohřátého na 50 °C, pak centrifugováno 1 min při 11 000 g.
 - Dále bylo přidáno 600 µl roztoku A4 (s ethanolem!), centrifugováno 1 min při 11 000 g
- Usušení silica membrány
 - Kolonky byly vloženy do nových sběrné zkumavek a následně centrifugovány 2 min při 11 000 g.
- Eluce DNA
 - V posledním kroku byly kolonky přemístěny do 1,5 ml ependorfev, Přidáno 50 µl roztoku AE, inkubováno 1 min za laboratorní teploty. Nakonec bylo centrifugováno 1 min při 11 000 g.

Pro oba kity byl postup totožný i co se týče objemu, lišily se jen názvy roztoků. Bylo postupováno podle návodu [11].

4.2.5 Příprava lyzátu z kitu

Na přípravu lyzátu z kitu bylo postupováno stejně jako u předchozího postupu 4.2.4, ale jen do 3. kroku daného postupu. Supernatant byl po centrifugaci odpipetován do další zkumavky a byl použit pro další pokusy.

4.2.6 Příprava lyzátu alkalickou lýzí

- Byla použita kultura narostlá přes noc v tekutém LB médiu s ampicilinem při 37 °C.
- Bylo odpipetováno 1,5 ml tekuté bakteriální kultury do Eppendorfovy zkumavky.
- Centrifugováno při 10 000 ot/min po dobu 3 minut
- Slit supernatant jedním převrácením zkumavky a osušen buničinou.
- K sedimentu buněk bylo přidáno 200 µl roztoku GLC, dále byl přidán 2,25 µl roztoku lysozymu o koncentraci 20 mg/ml (lysozym byl přidán do roztoku těsně, před použitím, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,2 mg/ml), bylo přidáno 22,5 µl roztoku RNázy o koncentraci 100 µg/ml (tak aby byla výsledná koncentrace 10 µg/ml)
- Vzorek byl roztřepán na vortexu a inkubován 5 min. za laboratorní teploty.
- Mezitím byla připravena lázeň o 0 °C (směs vody a ledu).
- Bylo přidáno 300 µl roztoku LYZ, šetrně pětikrát promícháno převrácením zkumavky, inkubováno přesně 5 minut při 0°C.
- Přidáno 300 µl HS, šetrně pětikrát promícháno převrácením zkumavky, inkubováno po dobu 15 minut při teplotě 0 °C.
- Centrifugace probíhala při 14 000 ot/min po dobu 5 minut, při t = 4 °C
- Supernatant (lyzát) obsahující pDNA byl odpipetován do čisté Eppendorfovy zkumavky a dále použit na další pokusy.

4.2.7 Izolace a přečištění pDNA z lyzátu s pomocí magnetických nosičů

Byly provedeny 3 různé pokusy za použití magnetických nosičů:

- A) Přečištění magnetickými nosiči v kombinaci s (8-20 %) PEG 8 000 a 1 M NaCl.
- B) Přečištění magnetickými nosiči v kombinaci 16 % PEG 6 000 a 2 M NaCl.
- C) Přečištění magnetickými nosiči a ethanolu.

Začátek pokusů A-C se mírně liší, jinak bylo postupováno stejně. Ve všech případech bylo použito 50 μ l lyzátu (supernatantu) ať už z kitu nebo alkalické lýze a 50 μ l magnetického nosiče. V pokusu A byly napipetovány složky separační směsi podle Tabulky 2, ke které ještě přísluší kombinační Tabulka 1 udávající příslušnou koncentraci PEG 8 000, NaCl a izolovaného plasmidu. U pokusu B se postupovalo podle Tabulky 3. A v případě pokusu C bylo k supernatantu (lyzátu) pouze přidáno stejné množství magnetického nosiče. Objem lyzátu ku magnetickému nosiči byl vždy 1:1.

Tabulka 1: Tabulka, která shrnuje označení daného vzorku/kombinace. Udává výsledné hodnoty PEG 8000 a NaCl separační směsi k dané kombinaci vzorku k pokusu A. Tato tabulka navazuje na Tabulku 2, ve které jsou pak udány příslušné objemy k pipetování podle dané kombinace.

Označení vzorku/ Kombinace	Lyzát obsahující plasmid	Výsledná koncentrace PEG 8000 (%)	Výsledná koncentrace NaCl (mol/l)
a	pBluescript	8	1
b	pBluescript	12	1
c	pBluescript	16	1
d	pBluescript	20	1
e	pB-3MYC	8	1
f	pB-3MYC	12	1
g	pB-3MYC	16	1
h	pB-3MYC	20	1

Tabulka 2: Složení separační směsi pro pokus A

Pro kombinace →	a, e	b, f	c, g	d, h
Komponenta ↓	objem (μ l)	objem (μ l)	objem (μ l)	objem (μ l)
H ₂ O	220	180	140	100
5 M NaCl	100	100	100	100
Supernatant (lyzát) s plasmidy	50	50	50	50
50% PEG 8 000	80	120	160	200
magnetický nosič (2 mg/ml)	50	50	50	50
celkový objem	500	500	500	500

Tabulka 3: Složení separační směsi pro pokus B.

Komponenta	objem (μl)
5 M NaCl	200
Supernatant (lyzát) s pDNA	50
40 % PEG 6000	200
Magnetický nosič (2 mg/ml)	50
Celkem	500

Postup byl následovný:

1. Složky separační směsi byly napipetovány do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky v následovném pořadí a objemech, které jsou uvedeny v (Tabulky 2 (pokus A) nebo Tabulky 3 (pokus B)). Po promíchání komponent (pipetováním, mícháním, převrácením zkumavky, vortexováním) byla směs krátce stočena na minicentrifuze a 10 min inkubována při laboratorní teplotě. (Ideálně zkombinovat všechny 4 možnosti promíchání, PEG 8 000 je velmi viskózní).
2. Pak byla zkumavka se směsí umístěna do magnetického separátoru a magnetické částice byly separovány 10 min při laboratorní teplotě. (U možnosti C by bylo možno zkrátit dobu na polovinu.)
3. Po uplynuté době byl opatrně odebrán supernatant (zkumavka zůstala stále v separátoru).
4. Bylo přidáno 400 μl 80 % ethanolu.
5. Vzorek byl promíchán na vortexu, krátce stočen na minicentrifuze a vložen zpět do magnetického separátoru. Po 1 minutě byl ethanol opatrně odebrán. Tento krok byl opakován s 200 μl 80 % ethanolu. (Ethanol je potřeba připravit vždy čerstvý).
6. Po odebrání ethanolu byla otevřena zkumavka vložena do exikátoru s vakuem na 10 minut a ethanol se nechal odpařit. (Ethanol je nutno odpařit důkladně).
7. Pak bylo přidáno 25 μl TE pufru. pDNA adsorbována na magnetických částicích byla eluována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.
8. Po 15 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru po dobu 2 minut a eluát (supernatant) obsahující pDNA byl odebrán do čisté mikrozkušavky. (Supernatant odebírat opatrně bez magnetického nosiče)

4.2.8 Srovnání izolace pDNA kitem a magnetickými nosiči za použití stejného objemu lyzátu

Bylo použito 500 μl lyzátu jak pro izolaci pDNA kitem, tak pro izolaci pDNA pomocí magnetických nosičů a ethanolu. Jinak jsou postupy v podstatě stejné jako v bodech 4.2.4 a 4.2.7 C uvedených výše. V postupu 4.2.4 jde jen o změnu objemu použitého lyzátu a v postupu 4.2.7 C byl ještě navýšen objem použitého ethanolu na 1000 + 200 μl a objem TE pufru na 50 μl jinak vše ostatní zůstalo stejné. Pokusy A) a B) v bodu 4.2.7 nebylo z praktických důvodů možno vyzkoušet, proto byly přepočteny na teoretické hodnoty, kde je zahrnuta korekce na dané objemy lyzátu a elučního pufru.

4.2.9 Přečištění a izolace pDNA z lyzátu pomocí ethanolu

K 50 μ l supernatantu bylo přidáno 100 μ l abs. ethanolu, směs byla promíchána a inkubována 15 minut při -20 °C. Směs byla centrifugována při 14 000 rpm po dobu 6 minut. Supernatant byl šetrně vylit jedním převrácením Eppendorfovy zkumavky a zbytky roztoku stékajícího po stěnách zkumavky byly vysušeny pomocí filtračních papírů. Sediment byl vysušen v exikátoru 15 min a rozpuštěn ve 25 μ l TE pufru.

4.2.10 UV Spektrofotometrie

Pro stanovení koncentrace a čistoty vyizolované pDNA byly vzorky proměřeny na NanoDropu 2000. Jako blank byl použit eluční roztok v daném kitu v případě izolace magnetickými nosiči byl použit jako blank TE pufr.

4.2.11 Agarozová gelová elektroforéza plasmidové DNA

Byl připraven 1% agarosový gel (1 g agarosu/100 ml 1×TAE pufr); suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, nechala se vychladnout asi na teplotu 60 °C, přidalo se barvivo GelRed (5 μ l), roztok se promíchal a nalil se do elektroforetické vaničky s hřebínkem a nechal se cca 30 minut tuhnout. Před nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut. Vzorky byly smíchány s nanášecím pufem (6×koncentrovaný) v poměru 5:1. Směsi byly naneseny do komůrek gelu. Dále byl na gel nanesen hmotnostní standard DNA 1Kb. Gel byl vložen do elektroforetické vaničky tak, aby záporně nabitá DNA putovala k anodě. Vanička s gelem byla opatrně převrstvena 1×TAE pufrem do výšky 2-3 mm nad gel a byl zapnut zdroj gelové elektroforézy (110 V, cca 2 hodiny). Po skončení separace byl gel vyjmut a zdokumentován na dokumentačním systému c200 Azure Biosystems při 302 nm, popřípadě na transiluminátoru a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305$ nm. Byla provedena fotografická dokumentace gelu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1.1 Křížové roztěry na LB agarových plotnách s ampicilinem

Narostlé kolonie byly bílé barvy, bez známek kontaminace.

5.1.2 Submerzní kultivace v LB médiu s ampicilinem

Vzorky po kultivaci obsahovaly viditelný zákal značící nárůst buněk. Ty pak byly následně použity pro izolaci pDNA.

5.2 Shrnutí výsledků koncentrace a čistoty zjištěných pomocí UV spektrofotometrie

Byla stanovena koncentrace DNA z A_{260} nm a z poměru A_{260} / A_{280} byla stanovena její čistota. DNA lze považovat za čistou, pokud je hodnota A_{260} / A_{280} mezi 1,8-2. Optimální čistota DNA je při hodnotě 1,8. Pokud je hodnota $A_{260} / A_{280} < 1,8$ – jedná se o znečištění proteiny, a je-li $A_{260} / A_{280} > 2$ – jde o znečištění RNA [5].

5.2.1 Izolace plazmidové DNA pomocí kitu

Tabulka 4: Naměřené koncentrace a čistota pomocí kitů pro vzorky s pB-3MYC

kit	plasmid	c DNA (ng/μl)	$A_{260/280}$
KNSP	pB-3MYC	94,8	1,84
KNSP	pB-3MYC	61,2	1,83
KNSP	pB-3MYC	19,4	1,80
KNSP	pB-3MYC	25,1	1,69
KNSP	pB-3MYC	31,0	1,59
KNSP	pB-3MYC	20,9	1,82
KNSP	pB-3MYC	47,8	1,57
KNSP	pB-3MYC	25,4	1,87
KNSP	pB-3MYC	34,3	1,85
KNSP	pB-3MYC	25,1	1,64
KNSP	pB-3MYC	17,0	1,79
PMK	pB-3MYC	23,7	2,02

Průměrná koncentrace pDNA u vzorků pB-3MYC izolovaných přes KNSP se pohybovala okolo 36,54 ng/μl s průměrnou čistotou 1,75 v rozmezí hodnot (1,57-1,87). Většina vzorků dosahovala velmi dobré čistoty.

Tabulka 5: Naměřené koncentrace a čistota pomocí kitů pro vzorky s pBluescript

kit	plasmid	c DNA (ng/μl)	A _{260/280}
KNSP	pBluescript	21,5	1,66
KNSP	pBluescript	36,1	1,60
KNSP	pBluescript	21,6	1,67
KNSP	pBluescript	29,3	1,62
KNSP	pBluescript	26,1	1,56
KNSP	pBluescript	18,9	1,63
KNSP	pBluescript	81,8	1,79
KNSP	pBluescript	50,1	1,57
KNSP	pBluescript	63,6	1,80
PMK	pBluescript	116,3	1,80

Průměrná koncentrace pDNA u vzorků pBluescript izolovaných přes KNSP se pohybovala okolo 38,78 ng/μl s průměrnou čistotou 1,66 v rozmezí 1,56-1,8. Většina vzorků byla mírně kontaminována proteiny.

5.2.2 Shrnutí výsledků pokusu A přečištění lyzátů pomocí magnetických nosičů v kombinaci PEG 8000 (8-20%) a 1M NaCl

Tabulka 6: Tabulka kombinací udávající výslednou koncentraci PEG 8000, NaCl a plasmidu.

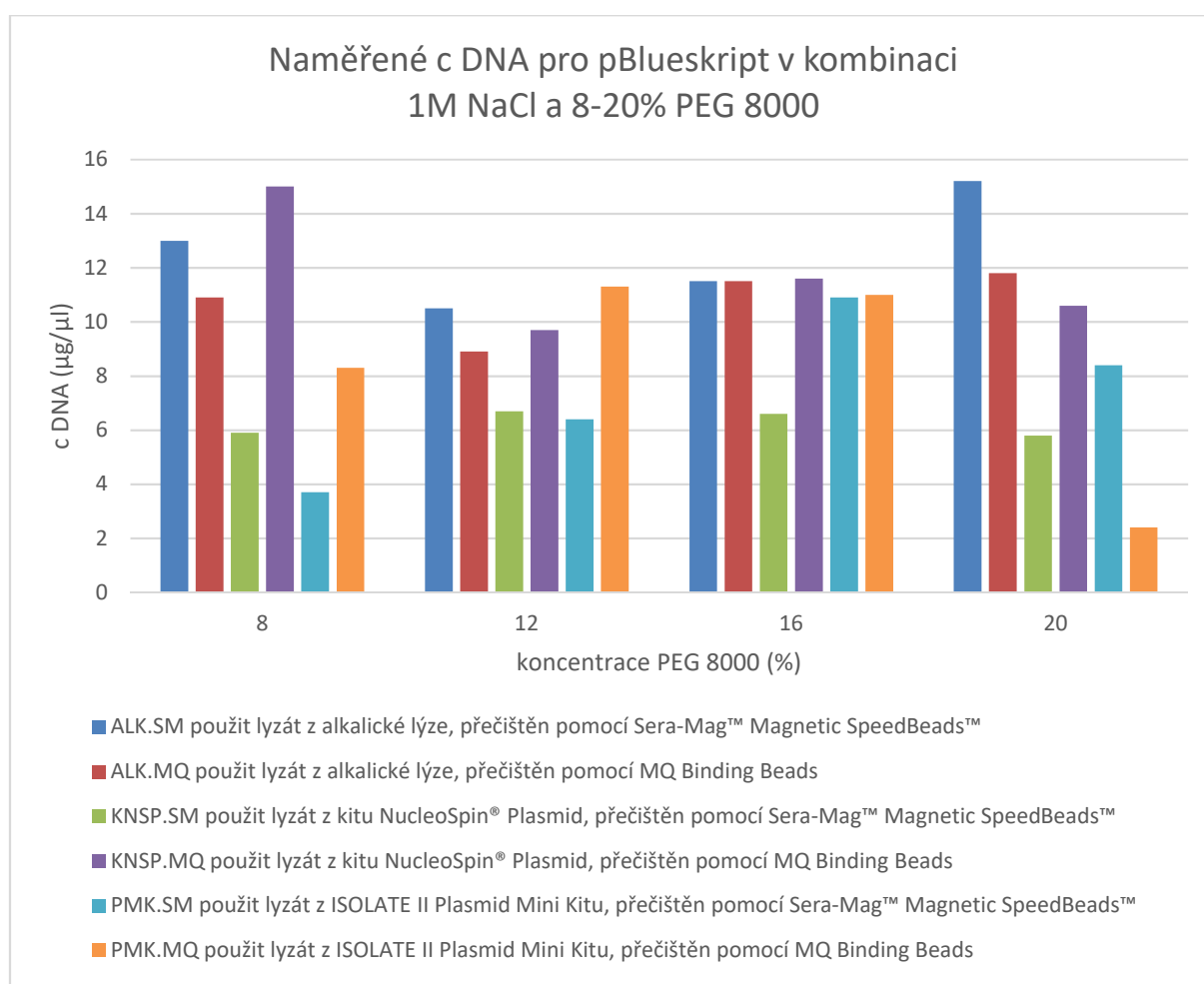
označení vzorku/ kombinace	Lyzát obsahující plasmid	výsledná koncentrace PEG 8000 (%)	výsledná koncentrace NaCl (mol/l)
a	pBluescript	8	1
b	pBluescript	12	1
c	pBluescript	16	1
d	pBluescript	20	1
e	pB-3MYC	8	1
f	pB-3MYC	12	1
g	pB-3MYC	16	1
h	pB-3MYC	20	1

Tabulka 7: Vysvětlující zkratky použité v následující tabulkách a grafech

zkratka:	použitý lyzát z:	použitý magnetický nosič:
ALK.SM	alkalické lýze	Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™
ALK.MQ	alkalické lýze	MQ Binding Beads
KNSP.SM	kitu NucleoSpin® Plasmid	Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™
KNSP.MQ	kitu NucleoSpin® Plasmid	MQ Binding Beads
PMK.SM	ISOLATE II Plasmid Mini Kitu	Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™
PMK.MQ	ISOLATE II Plasmid Mini Kitu	MQ Binding Beads

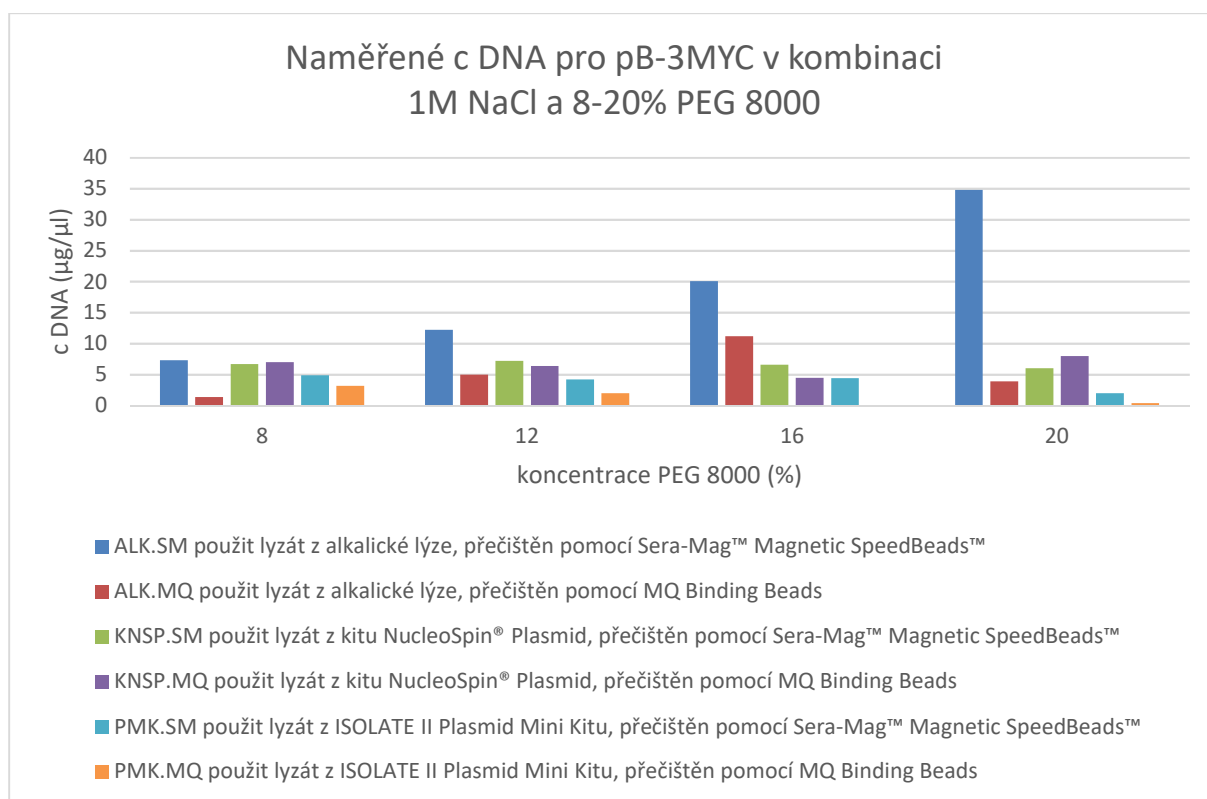
Tabulka 8: Naměřených koncentrace vyizolované pDNA pro pokus A

označení	vzorek	koncentrace nukleových kyselin (µg/µl)					
kombinace	plasmid	ALK.SM	ALK.MQ	KNSP.SM	KNSP.MQ	PMK.SM	PMK.MQ
a	pBluescript	13,0	10,9	5,9	15,0	3,7	8,3
b	pBluescript	10,5	8,9	6,7	9,7	6,4	11,3
c	pBluescript	11,5	11,5	6,6	11,6	10,9	11,0
d	pBluescript	15,2	11,8	5,8	10,6	8,4	2,4
e	pB-3MYC	7,3	1,4	6,7	7,0	4,9	3,2
f	pB-3MYC	12,2	5,0	7,2	6,4	4,2	2,0
g	pB-3MYC	20,1	11,2	6,6	4,5	4,4	0,0
h	pB-3MYC	34,8	3,9	6,0	8,0	2,0	0,4



Graf 1: Srovnání výtěžků koncentrace pro vzorky pBluescript

Z grafu jde vidět, že při použití 16% PEG 8000 jsou hodnoty koncentrací až na jedno měření poměrně vyrovnané.



Graf 2: Srovnání výtěžků koncentrací pro vzorky pB-3MYC

U ALK.SM se vzrůstající koncentrací PEG 8000 roste i koncentrace vyizolované pDNA. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo při použití lyzátu z alkalické lýze v kombinaci magnetických nosičů Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ v přítomnosti 20% PEG 8000 a 1M NaCl.

Tabulka 10: Shrnutí naměřené čistoty pDNA pokusu A

označení	vzorek	A _{260/280}					
		ALK.SM	ALK.MQ	KNSP.SM	KNSP.MQ	PMK.SM	PMK.MQ
a	pBluescript	1,95	1,15	1,66	1,82	2,26	1,59
b	pBluescript	1,63	1,24	1,72	1,87	2,22	1,65
c	pBluescript	2,25	1,18	1,75	1,84	2,06	1,90
d	pBluescript	2,23	1,39	1,59	1,77	1,93	2,73
e	pB-3MYC	2,20	2,29	1,91	1,67	1,38	2,06
f	pB-3MYC	1,91	1,64	1,40	1,66	2,04	2,85
g	pB-3MYC	2,30	1,23	1,67	1,73	2,21	0,94
h	pB-3MYC	2,06	1,82	1,74	1,65	3,61	-2,80

V případě ALK.SM tedy lyzátu použitého z alkalické lýze a přečištěno pomocí částic Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ se většina hodnot pohybuje nad 2, jde tedy o vzorky znečištěné RNA, což se prokázalo i na gelu, použitá RNáza nejspíš nefungovala.

U ALK.MQ alkalického lyzátu přečištěného magnetickými částicemi MQ Binding Beads se většina hodnot pohybuje pod 1,8 což značí znečištění proteiny.

KNSP.SM - Použit lyzát ze kitu NucleoSpin® Plasmid v kombinaci magnetického nosiče Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™. Většina hodnot je menších než 1,8, což značí znečištění vzorků proteiny.

U KNSP.MQ byl použit lyzát z kitu NucleoSpin® Plasmid v kombinaci magnetického nosiče MQ Binding Beads. V tomto případě kombinace bylo dosaženo nejlepších hodnot čistoty v porovnání s ostatními. Především u vzorků pBluescript pohybujících se v rozmezí 1,77-1,87. U vzorků pB-3MYC byly hodnoty menší než 1,8 značící kontaminaci proteiny. Hodnoty byly v rozmezí 1,65-1,73.

PMK.SM a PMK.MQ - V těchto pokusech byl použit stejný lyzát z ISOLATE II Plasmid Mini Kitu a dva různé magnetické nosiče. Jak je vidno volba magnetické částice dosti ovlivňuje výsledky čistot. V případě použití Sera-Mag částic jsou hodnoty pohybují kolem dvou v případě MQ částic jsou u poloviny vzorků hodnoty nad 2 a u druhé poloviny pod 1,8.

5.2.3 Shrnutí výsledků pokusu B přechištění lyzátů pomocí magnetických nosičů v kombinaci 16% PEG 6000 a 2M NaCl

Tabulka 11: Výsledky pokusu B

plasmid	lyzát/částice	c DNA (ng/μl)	A _{260/280}
pB-3MYC	ALK.SM	8,7	2,17
pB-3MYC	KNSP.MQ	4,1	1,51
pB-3MYC	ALK.MQ	3,6	1,87
pBluescript	ALK.SM	7,6	2,52
pBluescript	KNSP.MQ	15,8	1,94
pBluescript	ALK.MQ	11,1	1,18

Nejvyšší vyizolované koncentrace bylo dosaženo při použití lyzátu z alkalické lýze a magnetických nosičů Sera-Mag.

5.2.4 Shrnutí výsledků pokusu C přechištění lyzátů pomocí magnetických nosičů v kombinaci s ethanolem

Tabulka 12: Shrnutí výsledků pokusu C

plasmid	lyzát/částice	c DNA (ng/μl)	A _{260/280}
pBluescript	ALK.MQ	11,0	1,15
pBluescript	KNSP.MQ	39,1	1,80
pB-3MYC	ALK.MQ	16,0	1,85
pB-3MYC	KNSP.MQ	13,6	1,40

Nejlepšího výsledku bylo dosaženo, jak co se týče koncentrace vyizolované DNA, tak čistoty při použití lyzátu z kitu NucleoSpin® Plasmid a magnetických nosičů MQ Binding Beads.

5.2.5 Srovnání izolace pDNA kitem a magnetickými nosiči za použití stejného objemu lyzátu

Tabulka 13: Shrnutí srovnávacího pokusu

plasmid	Lyzát přečištěn	c DNA (ng/μl)	A _{260/280}
pBluescript	ISOLATE II Plasmid Mini Kitu	74,7	1,87
pBluescript	Sera-Mag TM Magnetic SpeedBeads TM	40,8	1,59
pBluescript	MQ Binding Beads	37,4	2,03
pB-3MYC	ISOLATE II Plasmid Mini Kitu	57,9	1,85
pB-3MYC	Sera-Mag TM Magnetic SpeedBeads TM	72,3	1,74
pB-3MYC	MQ Binding Beads	11,2	2,01

Ve všech případech bylo použito 500 μl lyzátu a 50 μl elučního pufru. U vzorků obsahujících plasmid pBluescript si nejlépe vedl ISOLATE II Plasmid Mini Kit, jak co se týče množství vyizolované pDNA, tak její čistoty. V případě vzorků obsahujících plasmid pB-3MYC si vedly nejlépe magnetické částice Sera-MagTM Magnetic SpeedBeadsTM. Magnetické částice MQ Binding Beads si v tomto případě vedly nejhůře jak co se týče množství vyizolované pDNA, tak čistoty.

5.2.6 Shrnutí výsledků přečištění lyzátů pomocí ethanolu

Tabulka 14: výsledky po přečištění vzorků ethanolem

plasmid	c DNA (ng/μl)	A _{260/280}
pB-3MYC	28,7	1,96
pB-3MYC	48,5	1,94
pBluescript	51,9	1,92
pBluescript	96,7	1,90

Při přečištění lyzátu ethanolem byly výsledky, jak co se týče koncentrace, tak čistoty velmi dobré. Lyzát byl připraven pomocí ISOLATE II Plasmid Mini Kitu.

5.2.7 Teoretické přepočty a porovnání koncentrace pDNA pomocí kitů a magnetických nosičů

Z technických důvodů při izolaci pomocí magnetických částic v kombinaci separační směsi A a B nebylo možno použít celých 750 μl, tak jako u vzorků, které byly separovány celé přes kit. Jednalo se především o to, že magnetický stojánek je určen jen na Ependorfovy zkumavky o objemu 1,5 a 2 ml. A dále proto, že bylo potřeba zachovat určité poměry komponent, aby dosahovaly správných výsledných koncentrací a zachovat u všech vzorků stejný celkový objem.

Objem elučního pufru u vzorků izolovaných celých přes kit byl 50 μl. U vzorků izolovaných magnetickými částicemi byl objem elučního pufru změněn z původních 50 μl na 25 μl, protože výtěžky koncentrací byly příliš malé.

Naměřené hodnoty koncentrace byly přepočteny na hmotnost DNA v μg, kdyby bylo použito 100 ml kultury. Výpočty zahrnují rozdílné objemy elučního pufru a použitého lyzátu.

Celkový objem lyzátu V_{PL} (-50 korekce na použitelný lyzát) odpovídá objemu použité kultury V_{PK} , x je pak teoretický objem lyzátu, který by byl použit při izolaci ze 100 ml kultury.

$$\frac{(V_{CL} - 50) \dots \dots V_{PK}}{x \dots \dots V_K}$$

$$x = \frac{(V_{CL} - 50) \cdot V_K}{V_{PK}}$$

$$m_{DNA} = \frac{(c_n \cdot V_{EP} \cdot K_{PL} \cdot V_K)}{V_{PK} \cdot 10^3} (\mu g);$$

$K_{PL} = \frac{V_{CL} - 50}{V_{PL}}$; podíl použitého lyzátu, který odpovídá naměřené koncentraci c_n a ta odpovídá danému objemu elučního pufru V_{EP} , což odpovídá podílu objemu použité kultury V_{PK}

$$m_{DNA} = \frac{(c_n \cdot V_{EP} \cdot (V_{CL} - 50) \cdot V_K)}{V_{PL} \cdot V_{PK} \cdot 10^3}$$

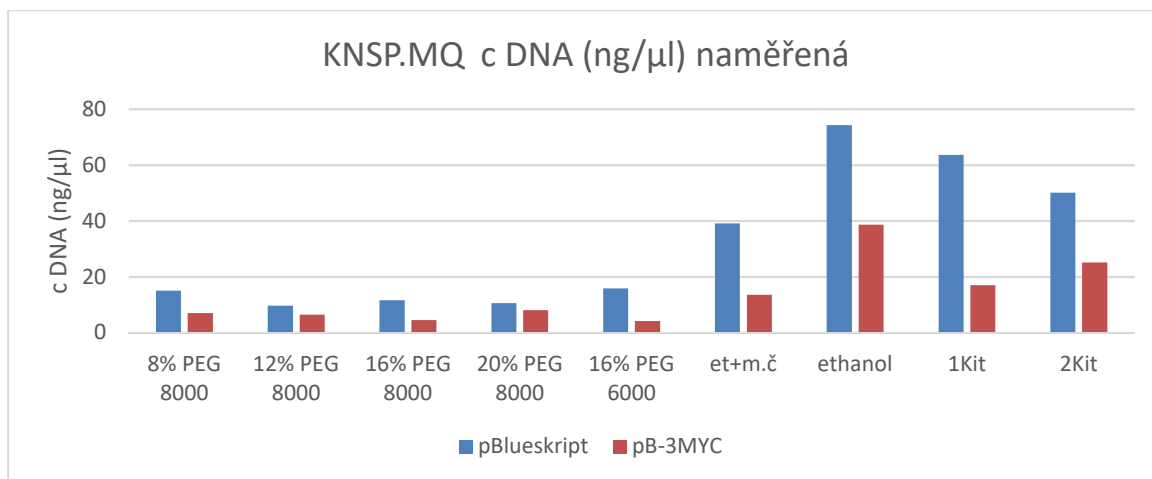
kde c_n je naměřená koncentrace DNA v ($\mu g/\mu l$), V_{EP} je objem elučního pufru v (μl), K_{PL} je konstanta určující podíl použitého lyzátu, V_K je objem 100 ml kultury, na kterou to chceme přepočít; V_{PK} je objem použité kultury při měření v (ml) (1,5 ml), 10^3 je pro přepočet z ng na μg , V_{CL} celkový objem lyzátu v (μl) a V_{PL} je objem použitého lyzátu v (μl) na 1 izolaci magnetickým nosičem

Objem lyzátu z kitu byl 800 μl z toho bylo použitelný ho 750 μl , a na jeden vzorek bylo odebráno 50 μl , proto $K_L = \frac{750}{50} = 15$

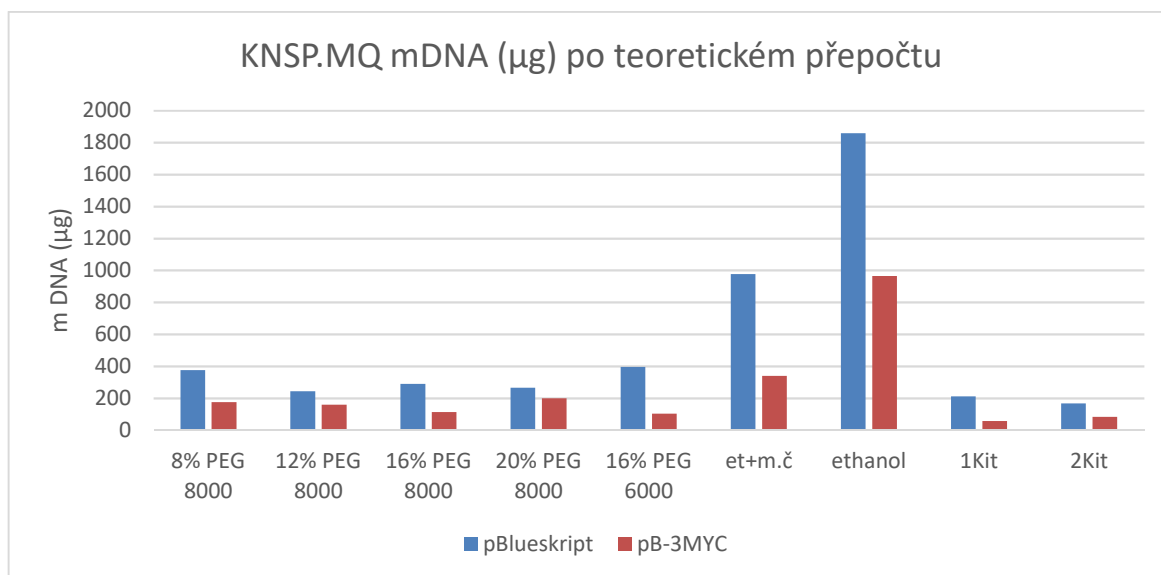
U pokusu, kdy bylo použito stejné množství lyzátu 500 μl i pufru 50 μl , bylo násobeno hodnotou 1,5. Objem lyzátu z kitu byl 800 μl z toho bylo použitelný ho cca 750 μl , a na jeden vzorek bylo odebráno 500 μl , proto $K_L = \frac{750}{500} = 1,5$

U vzorků, které byly celé izolovány přes kit bylo použito 750 μl , tím pádem $K_L = \frac{750}{750} = 1$

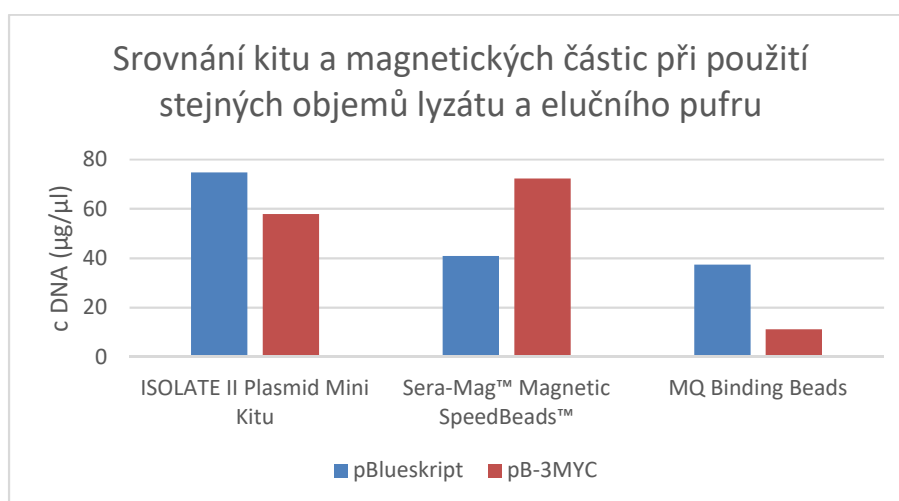
Pro uvedení příkladu srovnání byly vybrány vzorky izolovány ze stejnými částicemi a lyzátem v rámci jednoho pokusu. Konkrétně šlo o použití lyzátu z kitu NucleoSpin® Plasmid v kombinaci magnetického nosiče Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ Graf A ukazuje skutečné naměřené hodnoty a Graf B hodnoty po teoretickém přepočtu. U vzorků 8-20% PEG 8000, 16% PEG 6000, et+m.č a ethanol bylo použito vždy 50 μl lyzátu a 25 μl TE pufru. U vzorků označených 1Kit a 2Kit jde o vzorky izolované přes kit, kde bylo použito 750 μl a 50 μl elučního pufru. Nejlépe si vedly vzorky označené ethanol tedy, kdy byl lyzát přechištěn pouze ethanol, a to jak v reálné, tak teoretické rovině. Po přepočtu si nejhůře vedly vzorky izolované přes kit. Jde však o velmi hrubé výpočty, a tak byl učiněn pokus, kdy bylo použito stejné množství lyzátu i elučního pufru viz. Graf C.



Graf A: Srovnání naměřených hodnot koncentrací pomocí různých metod.

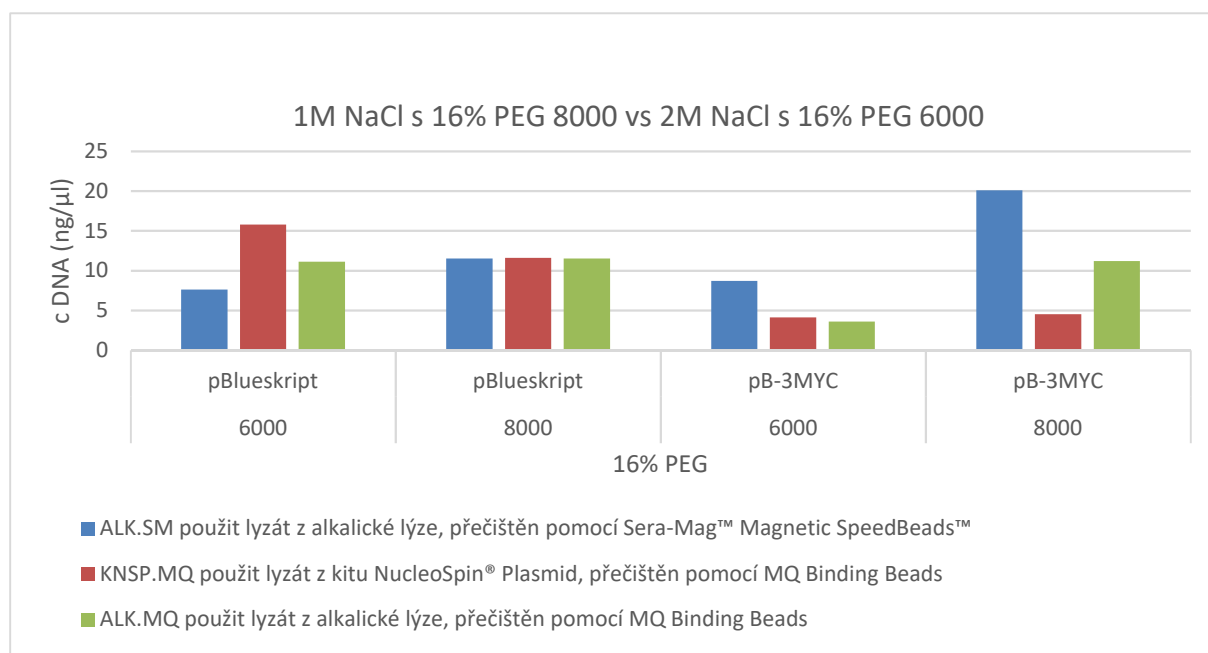


Graf B: Srovnání hodnot po teoretickém přepočtu.



Graf C: Srovnání kitu a magnetických částic při použití stejných objemů lyzátu a elučního pufru

Z grafu C lze vyčíst, že v podstatě si nejlépe vedl kit, ale jen nepatrně ve srovnání s magnetickými nosiči Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™. Bylo by potřeba naměřit více pokusů pro objektivní zhodnocení.



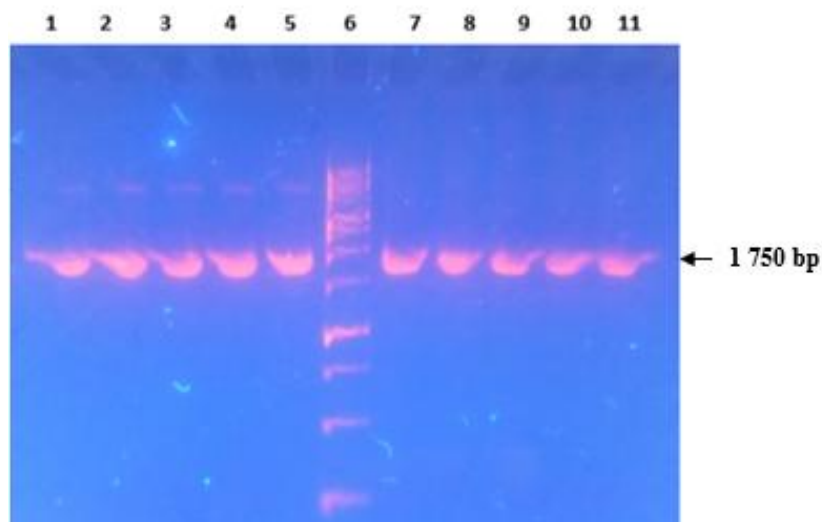
Graf D: Porovnání výsledků mezi různou koncentrací PEG a NaCl

U vzorků pBluescript jsou hodnoty poměrně vyrovnané. U vzorků pB-3MYC si lépe vedla kombinace PEG 8000 s 1M NaCl.

5.2.8 Výsledky agarózové gelové elektroforézy plasmidové DNA

Agarózová gelová elektroforéza slouží k rozdělení a identifikaci jednotlivých forem plasmidů respektive nukleových kyselin na základě jejich velikosti a náboje v stejnosměrném elektrickém poli. Záporně nabitě nukleové kyseliny putují ke kladné anodě s čímž je nutno počítat při připojení ke zdroji napětí. Nejrychleji putují gelem nejmenší RNA molekuly, potom plasmidová DNA a nejpomaleji genomová DNA. U plasmidové DNA pak navíc záleží, v jaké formě se nachází daná molekula. Nejrychleji putuje gelem sc forma, pak lineární, která odpovídá dané velikosti vektoru a nejpomaleji oc forma [5,6].

Některé pokusy typu A, B a C a vzorky izolované celé přes kit byly prováděny současně za použití lyzátu ze stejného kitu a magnetického nosiče a jsou tak zdokumentovány současně na jednom daném gelu.

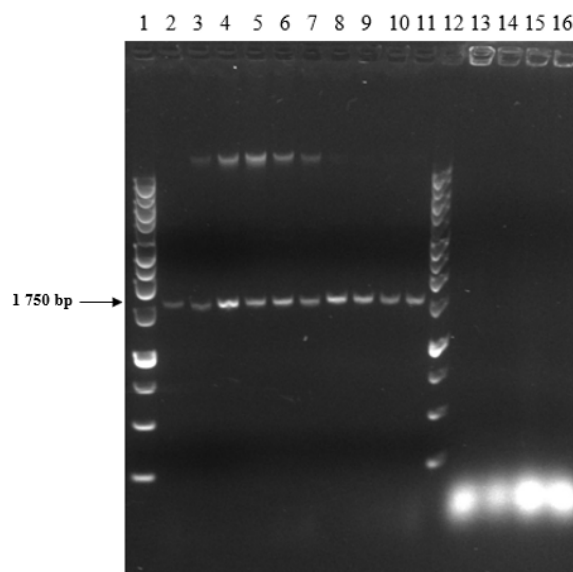


Obrázek 8: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plasmid. Schéma nanesení vzorků: Běh č.: 1-5 vzorky pBluescript, 6 standard DNA 1Kb o velikostech 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000 a 10 000 bp, 7-11 vzorky pB-3MYC. Příslušné koncentrace jsou uvedeny v tabulce 15.

U vzorků pBluescript je možno vidět 2 bandy, tzv. dvě různé formy plazmidové DNA. Intenzivnější band o velikosti 1 750 bp odpovídá sc formě pDNA (putuje gelem nejrychleji) a méně intenzivní band s velikostí 6 000 bp je v oc formě (putuje gelem nejpomaleji), lineární forma pDNA není přítomna, měla by velikost cca 3 kB, což by odpovídalo velikosti daného vektoru. U vzorků pB-3MYC je možno vidět jeden výrazný band o velikosti 1 750 bp odpovídající sc formě plazmidu.

Tabulka 15: Výsledky agarózové gelové elektroforézy pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plasmid

Běh č.	vzorek	Koncentrace (ng/μl)
1	pBluescript	26,1
2	pBluescript	29,3
3	pBluescript	21,6
4	pBluescript	36,1
5	pBluescript	21,5
6	standard DNA 1Kb	-
7	pB-3MYC	47,8
8	pB-3MYC	20,9
9	pB-3MYC	31,0
10	pB-3MYC	25,1
11	pB-3MYC	19,4

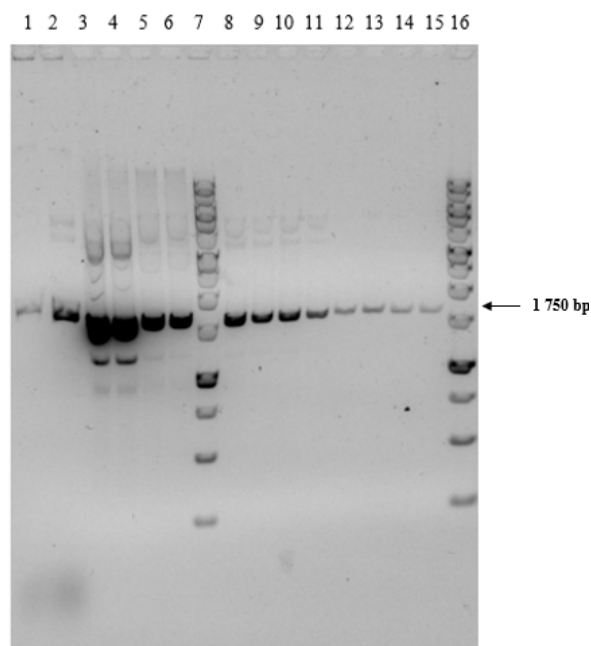


Obrázek 9: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí magnetických nosičů Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ za použití lyzátu z alkalické lýze. Schéma nanesení vzorků: Běh č.: 1 standard DNA 1 Kb, 2 vzorek pB-3MYC, 3-7 vzorky pBluescript, 8-11 vzorky pB-3MYC, 12 standard DNA 1 Kb, 13-14 lyzát s pBluescript, 15-16 lyzát s pB-3MYC. Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 16.

U vzorků pBluescript běhy 3-7 je možno vidět 2 bandy jeden band o velikosti 1 750 bp odpovídá se formě pDNA. Další nad žebříčkem DNA nejspíš odpovídá znečištění genomovou DNA. Při odebírání lyzátu u vzorků pBluescript došlo nejspíš k uvolnění sraženiny obsahující genomovou DNA. U vzorků pB-3MYC běh 2 a 8-11 je možno vidět jeden výrazný band o velikosti 1 750 bp odpovídající se formě plazmidu. Lyzáty viz. běhy 13-16, které byly použity pro izolaci DNA byly znečištěny RNA, což se projevilo detekcí skvrn pod žebříčkem.

Tabulka 16:

ALK.SM běh	vzorek lyzát	Způsob přečištění lyzátu	c DNA (ng/μl)
1	standard DNA 1Kb		
2	pB-3MYC	16% PEG 6000, 2M NaCl, magnetický nosič	8,7
3	pBluescript	16% PEG 6000, 2M NaCl, magnetický nosič	7,6
4	pBluescript	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	13,0
5	pBluescript	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	10,5
6	pBluescript	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	11,5
7	pBluescript	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	15,2
8	pB-3MYC	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	7,3
9	pB-3MYC	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	1,2
10	pB-3MYC	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	20,1
11	pB-3MYC	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	34,8
12	standard DNA 1Kb		
13	pBluescript - lyzát		225,3
14	pBluescript - lyzát		189
15	pB-3MYC - lyzát		386,1
16	pB-3MYC - lyzát		196,7

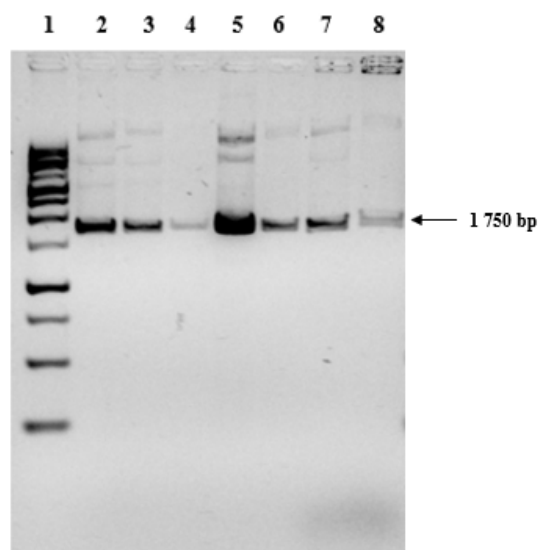


Obrázek 10: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí magnetických nosičů MQ Binding Beads za použití lyzátu z kitu NucleoSpin® Plasmid. Schéma nanesení vzorků: Běh č. 1 lyzát s pB-3MYC, 2 lyzát s pBluescript, 3 a 4 vzorek pBluescript, 5 a 6 vzorek pB-3MYC, 7 standard DNA 1Kb, 8-11 vzorky s pBluescript, 12-15 vzorky s pB-3MYC, 16 standard DNA 1Kb. Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 17.

U všech vzorků byla přítomna sc forma plasmidu.

Tabulka 17:

KNSP.MQ Běh	vzorek	Způsob přečištění lyzátu	c DNA (ng/μl)
1	pB-3MYC-lyzát		240,1
2	pBluescript-lyzát		330,1
3	pBluescript	Kit	63,6
4	pBluescript	Kit	50,1
5	pB-3MYC	Kit	17
6	pB-3MYC	Kit	25,1
7	standard DNA 1Kb		
8	pBluescript	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	15,0
9	pBluescript	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	9,7
10	pBluescript	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	11,6
11	pBluescript	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	10,6
12	pB-3MYC	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	7,0
13	pB-3MYC	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	6,4
14	pB-3MYC	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	4,5
15	pB-3MYC	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	8,0
16	standard DNA 1Kb		

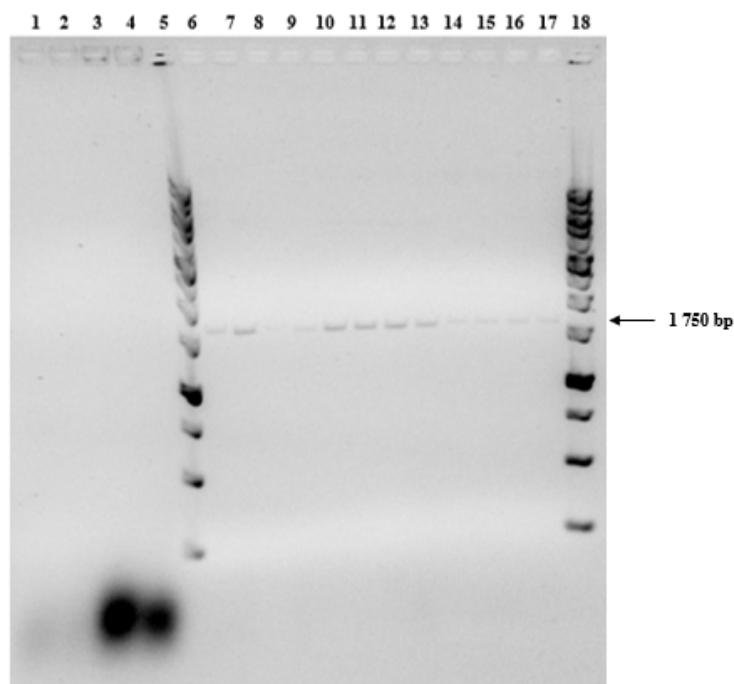


Obrázek 11: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí magnetických nosičů MQ Binding Beads za použití lyzátu z kitu NucleoSpin® Plasmid. Schéma nanesení vzorků: Běh č. 1 standard DNA 1Kb, 2-3 vzorky pBluescript, 4 vzorek pB-3MYC, 5 vzorek pBluescript, 6 vzorek pB-3MYC, 7 lyzát s pBluescript, 8 lyzát s pB-3MYC. Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 18.

U všech vzorků byla detekována sc forma pDNA. U lyzátu použitých pro následnou izolaci pDNA viz běhy 7 a 8 bylo vidět nepatrné znečištění RNA.

Tabulka 18:

	vzorek	Způsob přečištění lyzátu	c DNA
Běh	lyzát		(ng/μl)
1	standard DNA 1 Kb		
2	pBluescript	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	13,1
3	pBluescript	16% PEG 6000, 2M NaCl, magnetický nosič	15,8
4	pB-3MYC	16% PEG 6000, 2M NaCl, magnetický nosič	4,1
5	pBluescript	Ethanol, magnetický nosič	39,1
6	pB-3MYC	Ethanol, magnetický nosič	13,6
7	pBluescript -lyzát		171,9
8	pB-3MYC - lyzát		422,1

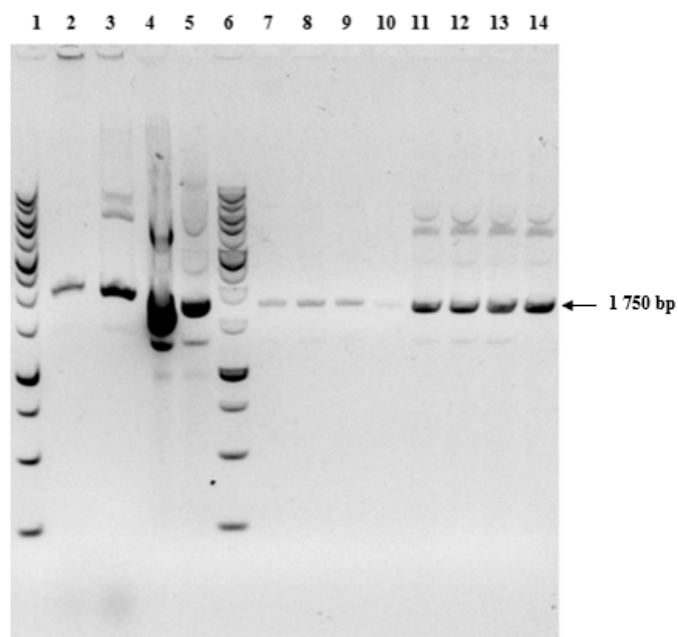


Obrázek 12: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí magnetických nosičů MQ Binding Beads za použití lyzátu z alkalické lýze. Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 19.

U všech vzorků byla detekována sc forma pDNA. Lyzáty s pBluescript použité pro následnou izolaci viz běhy 3 a 4 obsahovaly RNA

Tabulka 19:

ALK.MQ Běh	vzorek lyzát	Způsob přečištění lyzátu	c DNA (ng/μl)
1	pB-3MYC - lyzát		97,7
2	pB-3MYC - lyzát		107,7
3	pBluescript - lyzát		146,7
4	pBluescript - lyzát		105,6
5	Standart DNA		
6	pB-3MYC	Ethanol, magnetický nosič	16,0
7	pBluescript	Ethanol, magnetický nosič	11,0
8	pB-3MYC	16% PEG 6000, 2M NaCl, magnetický nosič	3,6
9	pBluescript	16% PEG 6000, 2M NaCl, magnetický nosič	11,1
10	pBluescript	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	10,9
11	pBluescript	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	8,9
12	pBluescript	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	11,5
13	pBluescript	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	11,8
14	pB-3MYC	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	1,4
15	pB-3MYC	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	5,0
16	pB-3MYC	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	11,2
17	pB-3MYC	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	3,9
18	Standart DNA		

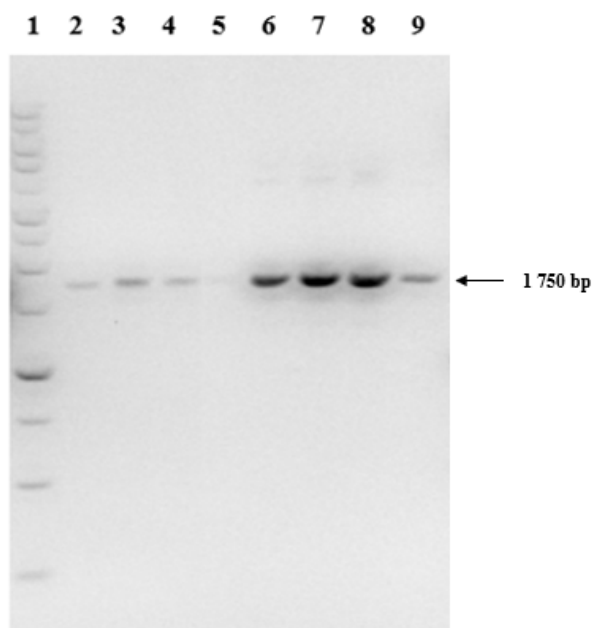


Obrázek 13: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí magnetických nosičů MQ Binding Beads za použití lyzátu z ISOLATE II Plasmid Mini Kitu, Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 20.

U všech vzorků byla detekována sc forma pDNA. U vzorků pBluescript byly detekovány i další formy pDNA jak oc, tak lineární.

Tabulka 20:

PMK.MQ	vzorek	Způsob přečištění lyzátu	c DNA
Běh	lyzát		(ng/μl)
1	Standard DNA 1 Kb		
2	pB-3MYC-lyzát		150,3
3	pBluescript-lyzát		263,1
4	pBluescript	kit	116,3
5	pB-3MYC	kit	23,7
6	Standard DNA 1 Kb		
7	pB-3MYC	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	0,4
8	pB-3MYC	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	0,0
9	pB-3MYC	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	2,0
10	pB-3MYC	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	3,2
11	pBluescript	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	2,4
12	pBluescript	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	11,0
13	pBluescript	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	11,3
14	pBluescript	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	8,3

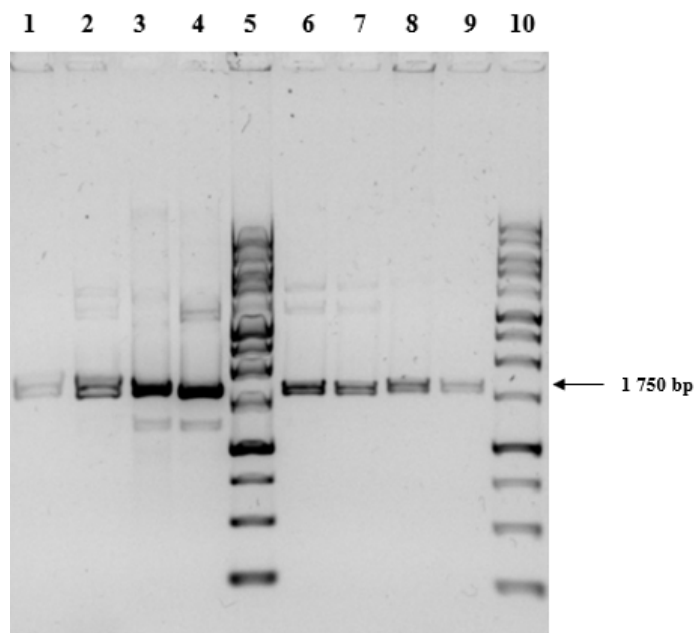


Obrázek 14: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí magnetických nosičů Sera-MagTM Magnetic SpeedBeadsTM za použití lyzátu z ISOLATE II Plasmid Mini Kitu, Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 21.

U všech vzorků byla detekována sc forma pDNA.

Tabulka 21:

PMK.SM	Vzorek	Způsob přečištění lyzátu	c DNA
Běh	lyzát		(ng/μl)
1	Standard DNA 1 Kb		
2	pB-3MYC	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	2,0
3	pB-3MYC	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	4,4
4	pB-3MYC	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	4,2
5	pB-3MYC	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	4,9
6		20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	8,4
7	pBluescript	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	10,9
8	pBluescript	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	6,4
9	pBluescript	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	3,7

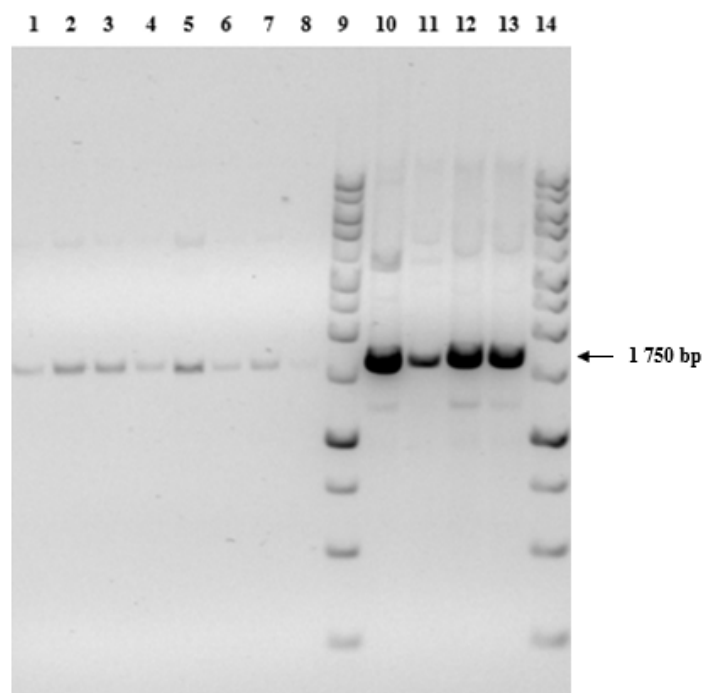


Obrázek 15: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí ethanolu za použití lyzátu z ISOLATE II Plasmid Mini Kitu, Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 22.

U všech vzorků byla detekována sc forma pDNA.

Tabulka 22:

PMK ehanol	Vzorek	Způsob přechštění lyzátu	c DNA
Běh	lyzát		(ng/μl)
1	pB-3MYC- lyzát		150,3
2	pBluescript-lyzát		263,1
3	pB-3MYC	kit	23,7
4	pBluescript	kit	116,3
5	Standard DNA 1 Kb		
6	pBluescript	ethanol	96,7
7	pBluescript	ethanol	51,9
8	pB-3MYC	ethanol	48,5
9	pB-3MYC	ethanol	28,7
10	Standard DNA 1 Kb		

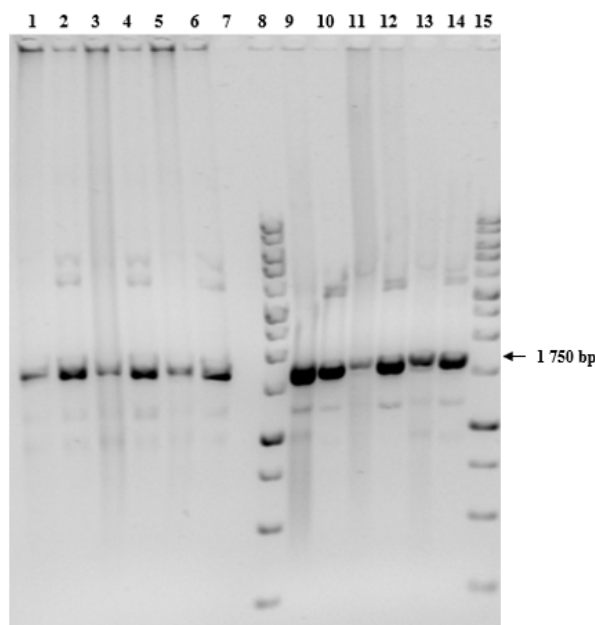


Obrázek 16: Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí magnetických nosičů Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ za použití lyzátu z kitu NucleoSpin® Plasmid. Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 23.

U všech vzorků byla zaznamenána sc forma pDNA.

Tabulka 23:

KNSP.SM Běh	Vzorek lyzát	Způsob přečištění lyzátu	c DNA (ng/μl)
1	pB-3MYC	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	6,0
2	pB-3MYC	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	6,6
3	pB-3MYC	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	7,2
4	pB-3MYC	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	6,7
5	pBluescript	20% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	5,8
6	pBluescript	16% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	6,6
7	pBluescript	12% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	6,7
8	pBluescript	8% PEG 8000, 1M NaCl, magnetický nosič	5,9
9	Standard DNA 1 Kb		
10	pBluescript	Kit	81,8
11	pBluescript	Kit	18,9
12	pB-3MYC	Kit	34,3
13	pB-3MYC	Kit	25,4
14	Standard DNA		



Obrázek 17: Srovnání kitu a magnetických částic za použití stejného objemu lyzátu a elučního pufru. Výsledky detekce pDNA vzorků pBluescript a pB-3MYC vyizolovaných pomocí magnetických nosičů Sera-MagTM Magnetic SpeedBeadsTM a MQ Binding Beads za použití lyzátu z ISOLATE II Plasmid Mini Kitu, Příslušné koncentrace a podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 24.

U všech vzorků byla detekována sc forma pDNA.

Tabulka 24:

Běh	Vzorek/lyzát	Způsob přečištění lyzátu	c DNA (ng/μl)
1	pB-3MYC - lyzát		132,7
2	pBluescript - lyzát		85,6
3	pB-3MYC - lyzát		182,6
4	pBluescript - lyzát		121,4
5	pB-3MYC - lyzát		171,8
6	pBluescript - lyzát		207,4
7			
8	Standard DNA 1 Kb		
9	pB-3MYC	MQ Binding Beads, ethanol	11,2
10	pBluescript	MQ Binding Beads, ethanol	37,4
11	pB-3MYC	Sera-Mag TM , ethanol	72,3
12	pBluescript	Sera-Mag TM , ethanol	40,8
13	pB-3MYC	Kit	57,9
14	pBluescript	Kit	74,7
15	Standard DNA 1 Kb		

Celkově: U všech vzorků ať už pB-3MYC nebo pBluescript byla detekována sc forma pDNA o velikosti 1 750 bp. V některých případech hlavně u vzorků pBluescript byla navíc detekována i oc forma pDNA, případě i lineární forma pDNA o velikosti cca 3 000 bp odpovídající velikosti plasmidu.

6 ZÁVĚR

S rozvojem genového inženýrství a genové terapie se kladou stále větší nároky pro nalezení ideální metody pro izolaci plasmidové DNA v dostatečném množství a čistotě. Je více metod, jak získat pDNA požadované kvality, některé jsou však časově a finančně náročné. A tak se hledají další možné alternativy. Potenciální výhodou magnetických nosičů je jejich možnost použití v automatických systémech.

Co se týče čistoty vyizolované pDNA, tak si vede podstatně lépe izolace pomocí kitu. Naměřené výsledky jsou spíš orientačního charakteru a byla by potřeba udělat pár změn a naměřit více experimentů, aby bylo možné objektivnějšího posouzení. Metoda magnetické separace při izolaci pDNA vyžaduje další experimenty pro nalezení optimálních podmínek. Zvolené koncentrace 8-20% PEG 8000 v kombinaci 1M NaCl a při použití kombinaci magnetických částic Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ a MQ Binding Beads se úplně neosvědčily, co se týče výsledků čistoty. Agarózová gelová elektroforéza potvrdila přítomnost se formy pDNA ve všech vzorcích, ať už u vzorků obsahujících plasmid pBluescript, tak pB-3MYC. Tato forma je ideální pro použití jako vektoru. V některých případech byly přítomny i další formy pDNA jako je oc, případně znečištění genomovou DNA či RNA. Šlo především o vzorky pBluescript.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: První díl*. 4., (inovované) vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2006. ISBN 80-902-5625-2.
- [2] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKÁŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPLÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [3] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902-9062-0.
- [4] BROWN, T. A., 2007. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [5] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [6] RUMML, Tomáš. *Genové inženýrství*. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 978-80-7080-499-5.
- [7] SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed., 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [8] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, vol. 36, issue 15, s. 2472-2485 [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.1002/jssc.201300331. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>
- [9] CHLOPKOVÁ, B. Magnetické nosiče a jejich praktické využití. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 35 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc..
- [10] BERENSMEIER, Sonja, 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 73(3), 495-504 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://link.springer-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s00253-006-0675-0>
- [11] User manual NucleoSpin® Plasmid. In: *MACHEY-NAGEL* [online]. [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf

- [12] BÍLKOVÁ, Kateřina a Blanka KRÁLOVÁ, 1997. *Izolace biomakromolekul*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0288-X.
- [13] DUARTE, Sónia p., António g. FORTES, Duarte m.f. PRAZERES a João c. MARCOS, 2007. Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process. *Journal of Chromatography A* [online]. Elsevier B.V, **1164**(1), 105-112 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.06.061. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0021967307011375>
- [14] TRACHTOVÁ, Štěpánka. Studium reversibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích. Brno, 2011. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [15] TEIF, Vladimír b. a Klemen BOHINC, 2011. Condensed DNA: Condensing the concepts. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* [online]. Elsevier, **105**(3), 208-222 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.07.002. ISSN 0079-6107. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0079610710000659>
- [16] BORLIDO, L., A.M. AZEVEDO, A.C.A. ROQUE a M.R. AIRES-BARROS. Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnology Advances* [online]. 2013, **31**(8), Pages 1374-1385 [cit. 2019-05-06]. ISSN 0734-9750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.009>
- [17] SHAN, Zhi, Youjun JIANG, Mengyu GUO, et al., 2015. Promoting DNA loading on magnetic nanoparticles using a DNA condensation strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. Elsevier B.V, **125**, 247-254 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.10.036. ISSN 0927-7765. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0927776514005864>
- [18] *Sera-MagTM and Sera-Mag SpeedBeads Magnetic Particles* [online], In: . [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=17293>
- [19] Mapa vektoru pBluescript SK-. In: *Genomics-online.com* [online]. [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://www.genomics-online.com/vector-backbone/53/pbluescript-sk-/>
- [20] LI, Huangjin, Huaben BO, Jinquan WANG, Hongwei SHAO a Shulin HUANG, 2011. Separation of supercoiled from open circular forms of plasmid DNA, and biological activity detection. *Cytotechnology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, **63**(1), 7-12 [cit. 2019-05-17]. DOI: 10.1007/s10616-010-9322-9. ISSN 0920-9069. Dostupné z: <https://link-springer-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s10616-010-9322-9>

[21] PRATHER, Kristala jones, Sangeetha SAGAR, Jason MURPHY a Michel CHARTRAIN, 2003. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. Elsevier, **33**(7), 865-883 [cit. 2019-05-17]. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00205-9. ISSN 0141-0229. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0141022903002059>

[22] LANDER, Russel j., Michael a. WINTERS, Francis j. MEACLE, Barry c. BUCKLAND a Ann l. LEE, 2002. Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, **79**(7), 776-784 [cit. 2019-05-17]. DOI: 10.1002/bit.10335. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.10335>

[23] RITTICH, Bohuslav, Alena ŠPANOVÁ, Magdalena SKALNÍKOVÁ a Milan j. BENEŠ, 2003. Chromatographic behaviour and purification of linear lambda phage and plasmid DNA molecules on 2-hydroxyethyl methacrylate–ethylene dimethacrylate-based supports. *Journal of Chromatography A* [online]. Elsevier B.V, **1009**(1), 207-214 [cit. 2019-05-17]. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00241-3. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0021967303002413#BIB3>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

bp	páry bází
pDNA	plasmidová DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
PEG	polyethylenglykol
PS	polystyren
PCR	polymerázová řetězcová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecyl sulfát sodný
UV	ultrafialové záření